

明細書

腎疾患治療又は予防剤及び腎疾患の診断方法

技術分野

本発明は、腎疾患治療又は予防剤及び腎疾患の診断方法に関する。

背景技術

腎臓は、体腔背側に左右対をなす泌尿器系器官であり、尿の生成により、1) 水分排泄、2) 代謝産物、特に窒素成分排泄、3) 電解質排泄、4) 異種物質排泄、5) 血液浸透圧・体液量および酸・塩基平衡調節など、生体恒常性を維持する。腎臓はさらに、レニンやプロスタグランジンの産生と分泌を介して血圧の調節を、また、エリスロポエチンの産生を介して骨髓における赤血球の分化・成熟の調節を、さらにビタミンDの前駆体である25-ヒドロキシビタミンDを活性化する機能など、重要な生理機能を担っている臓器である (Blood, 68 (Suppl), 170a, 1986, Proc Natl Acad Sci USA, 28, 1199, 1981)。腎臓は約100万個のネフロンと呼ばれる機能単位の集合体であり、ネフロンは、糸球体、ボーマン嚢、近位尿細管、ヘレン係蹄、遠位尿細管よりなる。ネフロンは集合管に合流し、集合管は腎盂に開口する。糸球体は、球状の毛細血管塊で血液をろ過して原尿を生成する。原尿は尿細管で再吸収と分泌を受け、最終尿が生成される。通常、糸球体は濾過過程において血液中の必要な物質、特に血清蛋白が尿中に漏出しないように制御しているが、糸球体に障害が生じると構成細胞の1つであるメサングウム細胞の増殖と周辺基質の増加が起こり、尿中への蛋白の排泄量が増加する。尿中蛋白排泄量が増加すると、この蛋白自体が尿細管を障害し、それがさらに糸球体障害を増悪するという悪循環に陥って以後急速に腎機能が低下する。

代表的な腎疾患として、糸球体および尿細管間質性腎炎あるいは糖尿病性腎症がある。急性腎炎症候群、急速進行性腎炎症候群、反復性あるいは持続性血尿症候群、慢性腎炎症候群、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、ループス腎炎、IgA腎症、慢性腎盂炎、腎硬化症、腎性高血圧、痛風腎、急性腎不全または慢性腎不全などが知られている。腎疾患は複雑で多様な病態を呈するが、いずれも慢性化すると腎不全にいたる重篤な経過をたどることがある。腎疾患の治療方法として

は、現在、その重度に応じて、腎臓機能保持のための療法、例えば安静療法、食事療法もしくは薬物療法、血液透析療法または腎臓移植が知られている。特に腎不全に陥ると、血液透析や腹膜透析などの透析療法や腎移植が必要となる。血液透析療法は、腎疾患の最終療法とされているが、腎臓機能障害により体内に貯留される老廃物を血中から除去するのみで、重度の障害を受けた腎臓の機能は回復せず、患者は苦痛と煩雑さを伴い施設と経費のかかる透析療法を一生継続しなければならない。しかも最終的には、多くの場合、心不全、感染症等を併発し死に至る。近年、新規に透析の導入に移行する患者数は年々増加し、経済的、社会的な面から問題となっている。腎不全の唯一の根治療法は腎移植であるが、提供者の不足、組織適合の難しさや拒絶反応の回避など問題が多く、実施例は少なく、根本的な治療法もしくは治療薬の開発が望まれている。腎不全の原因となる疾患や病態は数多くあるが、腎炎および糖尿病性腎症は原因疾患として最大の頻度を占めており、これらの腎疾患の治療および予防は腎疾患領域における最大の課題の一つである。腎炎は糸球体の障害から始まる糸球体腎炎と尿細管から始まる尿細管腎炎とがあり、前者の場合は糸球体の損傷に続いて尿細管の荒廃が起こるが、後者の場合は尿細管の荒廃に限られる。臨床的には重要なループス腎炎、IgA 腎症などは糸球体腎炎に含まれるが、その発症機序として免疫学的な機序と非免疫学的な機序とが考えられる。前者の例としてブドウ球菌、溶連菌などの細菌やB型肝炎、麻疹などのウィルスに由来する抗原と、これらに対する抗体とからなる免疫複合体の糸球体への沈着が知られているが、現在ではこの他にも多様な原因があると考えられており未解決の部分が多い。持続的な慢性腎炎により体液中の老廃物の排泄が滞ることによって腎臓への負担が増加し、さらに腎炎の進行を助長し荒廃が進む。糸球体および尿細管が完全に荒廃し腎不全に陥った腎臓は自力で再生することはなく、また再生させ得る治療法もしくは治療薬は現在までに完成されていない。急性腎炎や軽度な慢性腎炎にはステロイド性抗炎症剤が用いられるが、慢性腎炎が悪化しいわゆる腎不全に陥った場合の根本的な治療法はなく、透析治療を続けるほかはない。しかしながら、腎臓においてはホルモン等の分泌もまた機能として非常に重要であり、特に近位尿細管の荒廃によりここで産生さ

れるエリスロポイエチンが減少すると深刻な貧血に陥る。このため早い段階での的確な診断および治療が望まれている。

現時点での薬物治療は腎炎ではステロイド性抗炎症剤を中心に、病因や病態に応じて免疫抑制剤、抗血小板剤、降圧剤、利尿剤などが用いられる。また糖尿病性腎症においては厳格な血糖コントロールとともに、アンジオテンシン変換酵素阻害剤や、ATIIレセプターブロッカー、カルシウムブロッカーなどの降圧剤が用いられている。しかしながら、これらの従来の腎疾患治療剤では腎不全への進展を十分に阻止することは困難であり、根本的な治療にはほど遠いのが現状である（岡博・和田攻責任編集、「医科学大辞典」、追補5、最新の治療情報、第218ページ、講談社、1988年）。このように腎疾患の治療用薬剤として未だ十分に満足し得るような薬剤が存在するとはいえないのが現状である。また、長期連用による副作用も問題とされており、基本的には患者の安静や食事療法を主体とした予防・治療が行われている現状にある。腎疾患における薬物治療は未だ試行錯誤の状態であり、有効な薬剤の開発が望まれている。

発明の開示

従って、本発明の目的は、有効な腎疾患治療又は予防剤、および腎疾患の診断方法を提供することである。

本発明者らは、上記課題を解決するために、抗糸球体基底膜抗体誘発によるラット動物モデルの腎炎を研究対象として鋭意研究を重ねた。すなわち、本モデルの腎疾患状態の腎臓での遺伝子発現と、非腎疾患状態の腎臓での遺伝子発現を比較することにより、腎疾患状態の腎臓で発現する遺伝子の探索を進めたところ、腎疾患状態の腎臓において、カゼインキナーゼ2が顕著に増加していることを見いだした。さらに、カゼインキナーゼ2の発現を指標とすることで腎疾患を診断できるうえ、カゼインキナーゼ2の阻害物質の投与により腎疾患の治療又は予防することができることを実証し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、カゼインキナーゼ2を阻害する物質を有効成分として含有する腎疾患の治療又は予防剤を提供する。また、本発明は、生体から分離した試料中のカゼインキナーゼ2の活性若しくは含有量又はカゼインキナーゼ2遺伝子

の発現量を測定することを含む、腎疾患の診断方法を提供する。また、本発明は、カゼインキナーゼ2を阻害する物質の、腎疾患の治療又は予防剤製造のための使用を提供する。さらに、本発明は、カゼインキナーゼ2を阻害する物質の有効量を、腎疾患患者又は腎疾患の予防が望まれるヒトに投与することを含む腎疾患の治療又は予防方法を提供する。

本発明による腎疾患治療又は予防剤は、従来の薬剤で十分な効果が期待できなかった腎疾患の優れた治療又は予防剤となる。さらに本発明の腎疾患の診断方法（腎疾患の検出方法）によって腎疾患の病態を的確に効率よく診断ないしは検出することができる。

図面の簡単な説明

図1は、腎臓組織すなわち腎臓を構成する細胞におけるカゼインキナーゼ2遺伝子の発現量と、尿中蛋白排泄量すなわち腎疾患の状態との関係を示す図である。

図2は、腎炎のラットモデルにおける尿中蛋白排泄量に対するカゼインキナーゼ2 α サブユニットのアンチセンス・オリゴヌクレオチド投与の効果を示す図である。* : $p < 0.05$

図3は、カゼインキナーゼ2の酵素活性に対するアピゲニンの阻害作用を示す図である。

図4は、腎炎のラットモデルにおける尿中蛋白排泄量に対するカゼインキナーゼ2阻害剤のアピゲニン投与の効果を示す図である。* : $p < 0.05$

図5は、腎炎のラットモデルにおける尿中蛋白排泄量に対するカゼインキナーゼ2阻害剤投与の効果を示す図である。* : $p < 0.01$

図6は、腎炎のラットモデルにおける血中クレアチニン濃度に対するカゼインキナーゼ2阻害剤投与の効果を示す図である。* : $p < 0.01$

図7は、腎炎のラットモデルにおける内因性クレアチニンクリアランスに対するカゼインキナーゼ2阻害剤投与の効果を示す図である。* : $p < 0.01$

発明を実施するための最良の形態

本発明の腎疾患治療又は予防剤の治療又は予防対象となる腎疾患は、腎疾患で

あれば特に限定されるものではなく、例としては、糸球体腎炎、間質性腎炎、腎硬化症、糖尿病性腎症、慢性および急性腎不全があげられる。さらに、急性糸球体腎炎症候群、急速進行性糸球体腎炎症候群、反復性あるいは持続性血尿症候群、IgA 腎症、慢性腎盂炎、ネフローゼ症候群、ループス腎炎、腎性高血圧、痛風腎、急性尿細管間質性腎炎、慢性尿細管間質性腎炎、腎梗塞、薬剤性腎障害、移植腎の機能不全、腎結石や尿管閉塞に伴う腎機能障害などが挙げられる。なかでも、非糖尿病性の腎疾患は好対象である。とりわけ、腎炎は好対象である。とくにカゼインキナーゼ 2 の発現亢進もしくは酵素活性亢進により特徴づけられる上記の疾患は好対象である。本発明は、ヒトの疾患に適用されるほか、サル、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、ラット、マウスなどの哺乳動物にも適用され、ヒトのみならず動物用医薬品とすることができる。なお、本発明の腎疾患の治療又は予防剤は、腎疾患の治療、腎疾患の予防、並びに腎疾患の治療と症状の悪化の予防に並行して行うのに有用である。

上記の通り、本発明の腎疾患治療又は予防剤は、カゼインキナーゼ 2 を阻害する物質を有効成分として含有する。カゼインキナーゼ 2 は蛋白質であり、基質特異性の広い多機能性のプロテインキナーゼの一種である。真核細胞に広く分布し、細胞質、核に存在する。分子量 41~44 kD の α サブユニット、 α' サブユニットと 24~28 kD の β サブユニットからなり、分子量 130~140 kD の $\alpha\alpha\beta\beta$ あるいは $\alpha\alpha'\beta\beta$ の四量体からなる (Biochemistry、28、4072-4076 (1989) ; Biochemistry、29、8436-8447 (1990) ; Biochemistry、28、9053-9058 (1989)) 。 α サブユニットおよび α' サブユニットに活性中心があり、酵素として蛋白質のセリン、トレオニン残基をリン酸化し、ATP、GTP をリン酸供与源として利用すると考えられている。しかしながら現在に至るまで、カゼインキナーゼ 2 の生体内における意義や、病態時における意義の解明は十分にはなされていない。さらにカゼインキナーゼ 2 が腎疾患の腎臓で発現することや、カゼインキナーゼ 2 の阻害物質の投与により腎疾患が治療又は予防できることは知られていなかった。カゼインキナーゼ 2 を阻害することにより、腎疾患が予防または治療できるという事実は、従来技術からは全く予期し得ないことであ

り、本発明者らによって初めて見出されたことである。

下記実施例において具体的に記載されるように、本願発明者らは、腎疾患状態にある腎臓細胞中におけるカゼインキナーゼ2遺伝子の発現量が、正常な腎臓細胞中における発現量よりも有意に多くなっていることを見出し、かつ、カゼインキナーゼ2を阻害する物質を投与することにより、腎疾患状態が有意に改善されることを見出した。従って、本発明の腎疾患治療又は予防剤に有効成分として含有される、カゼインキナーゼ2を阻害する物質は、カゼインキナーゼ2を阻害することができる、薬剤上許容できるいずれのものであってもよい。これらは、従来有効な治療法のなかった腎疾患に対する治療又は予防剤として有用である。腎疾患状態にある腎臓を構成する細胞では、実施例にも示されるように正常な腎臓を構成する細胞に比べて、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現量が有意に多い。腎臓を構成する細胞におけるカゼインキナーゼ2の遺伝子の発現量が多いほど腎疾患の状態は悪く、発現量が適正に近いほど腎疾患の状態は正常に近い。このことは遺伝子の発現に限らず蛋白質の発現においても同じであり、実施例にも示されるように腎疾患状態にある腎臓の構成細胞では、正常な腎臓の構成細胞に比べてカゼインキナーゼ2の蛋白質の発現量すなわち含有量もまた有意に多い。腎臓の構成細胞におけるカゼインキナーゼ2の蛋白質の発現量すなわち含有量が多いほど腎疾患の状態は悪く、発現量すなわち含有量が適正に近いほど腎疾患の状態は正常に近い。また、カゼインキナーゼ2の蛋白質の発現量すなわち含有量は、カゼインキナーゼ2の酵素活性すなわち機能と極めて密接な関係にある。すなわち実施例にも示されるように、カゼインキナーゼ2の蛋白質量が多いほど、カゼインキナーゼ2の酵素活性すなわち機能は高い。これらのことは、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現、蛋白質の発現量すなわち含有量、および酵素活性すなわち機能が高いほど腎疾患の状態は悪く、これらが抑制され適正に近いほど腎疾患の状態は正常に近いこと示している。さらに、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現、蛋白質の発現量すなわち含有量、および酵素活性すなわち機能を低下あるいは阻害する手段、およびそれらを低下あるいは阻害する機能を有する物質は、いずれの手段および物質による場合においても、腎疾患の状態を正常に近い状態にさせ

る作用あるいは効果を有し、腎疾患を治療および予防する作用あるいは効果を有することが一般的に認識できる理論的な説明がなされる。この例として、腎疾患状態にある腎臓に対して種々の手段（たとえば、アンチセンス・オリゴヌクレオチドを用いてカゼインキナーゼ2の発現を阻害する手段、または化合物を用いてカゼインキナーゼ2の酵素活性を阻害する手段）によりカゼインキナーゼ2を阻害すれば、いずれの手段においても腎疾患の状態を正常に近い状態にさせる作用あるいは効果を有し、腎疾患を治療および予防する作用あるいは効果を有することは実施例にも示されている。言い換えれば、腎疾患状態にある腎臓に対して、カゼインキナーゼ2を阻害する機能を有する種々の物質（たとえば、カゼインキナーゼ2の発現を阻害する物質のアンチセンス・オリゴヌクレオチド、またはカゼインキナーゼ2の酵素活性を阻害する物質の化合物）は、いずれの物質においても腎疾患の状態を正常に近い状態にさせる作用あるいは効果を有し、腎疾患を治療および予防する作用あるいは効果を有することは実施例にも示されている。すなわち、一般にカゼインキナーゼ2を阻害する作用を有する手段および物質は腎疾患を治療および予防する作用を有することが明らかにされる。従って、本発明の腎疾患治療又は予防剤に有効成分として含有される、カゼインキナーゼ2を阻害する物質は、カゼインキナーゼ2を阻害することができる、薬剤上許容できるいずれのものであってもよく、これは従来有効な治療法のなかった腎疾患に対する治療剤および予防剤として有用である。さらに、そのようなカゼインキナーゼ2の遺伝子の発現、発現量すなわち含有量、および酵素活性すなわち機能を指標とすることで腎疾患を診断することもできる。なお、カゼインキナーゼ2は既知なものであり、当業者はカゼインキナーゼ2を阻害する手段および物質を想定することができ、またこれらは本発明においても詳細に説明されている。したがって当然のことであるが、これらはいずれにおいても当業者であれば通常の技術の範囲内で十分に行われるものである。

本発明において、腎疾患の治療又は予防に有用なカゼインキナーゼ2の阻害物質としては、結果的にカゼインキナーゼ2の効果を減少させるものであればよく、好ましいものとして、(1)カゼインキナーゼ2遺伝子の発現を阻害する物質（ア

ンチセンスオリゴヌクレオチド、RNAi、リボザイム等の転写、翻訳、修飾阻害物質）及び（2）カゼインキナーゼ2の酵素活性を阻害する物質（酵素活性の競合的もしくは非競合的な阻害物質、抗カゼインキナーゼ2抗体及びその抗原結合性断片等）を挙げることができる。また、カゼインキナーゼ2を分解する物質
5 やカゼインキナーゼ2の分解を促進する物質も使用可能である。また、カゼインキナーゼ2に関連するシグナル伝達系を生体内又は試験管内で本質的に阻害又は排除する物質であってもよい。これらの阻害物質は、下記実施例に具体的に記載される酵素活性測定法によって決定されるカゼインキナーゼ2の機能的活性を少なくとも約30%、好ましくは約50%、より好ましくは80%以上阻害又は減
10 少させるものである。酵素活性測定法は、通常の酵素活性測定に慣用されている方法により、困難なく実施することができる。具体的な測定方法は後述する。

以下、これらのカゼインキナーゼ2阻害物質についてさらに詳細に説明する。

上記の(1)カゼインキナーゼ2遺伝子の発現を阻害する物質としては、カゼインキナーゼ2の各サブユニットの遺伝子もしくは蛋白質の発現（転写、翻訳）または翻訳後の修飾を阻害する核酸、化合物、ペプチド等を挙げることができる。
15 好ましくは核酸であり、核酸の好ましいものとしては、カゼインキナーゼ2遺伝子に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、RNAiやリボザイムが例として挙げられる。さらに、カゼインキナーゼ2アンチセンス遺伝子を含有する遺伝子治療用導入用ベクターおよび該ベクターによりカゼインキナーゼ2アンチセンス遺伝子を導入した細胞、並びに該遺伝子治療用導入用ベクターおよび該ベクターによりカゼインキナーゼ2アンチセンス遺伝子を導入した細胞を有効成分とする遺伝子治療剤などもこの例に含まれる。
20

正常の細胞内では、遺伝子DNA→mRNA→蛋白質という流れで遺伝子情報が伝達されていく。蛋白質をコードするmRNAの塩基配列をセンス配列と呼び、
25 この配列に対して相補的な塩基配列をアンチセンス配列と呼ぶ。なお、アンチセンス配列は、原核生物（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第81巻、第1966-1970頁（1984年）に掲載のT. Mizuno、M-Y Chou およびM. Inoueの論文）と真核生物（Nucleic Acids Res. 第14巻、第6771-6772頁（1986年）に掲載のS. M. Heywood

の論文)との双方において遺伝子発現の自然発生的な生物学的抑制因子として説明されており、これらの配列は、相補的なmRNA配列に対してハイブリダイズさせることにより、翻訳の阻害を行なうように機能するものと考えられる (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第74巻、第4370-4374頁(1977年)に掲載のB. M. Paterson、B. E. Roberts およびE. L. Kuffの論文)。アンチセンス・オリゴヌクレオチドを含めオリゴヌクレオチドは、ワトソン-クリックの塩基対形成により定義されるように、前駆体mRNAもしくは成熟mRNAのいずれかの相補的な塩基配列に特異的にハイブリダイズする。この用語には、天然に存在する塩基、糖、および糖間(主鎖)結合からなるオリゴマー、ならびに類似する様式で機能する天然非存在性部分を有するオリゴマーがある。アンチセンス法とは簡単に言えば、ある遺伝子DNAから転写されたmRNAに相補的な塩基配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチドを化学的に合成し、細胞や個体に投与してmRNAの相補的な一本鎖配列または二本鎖配列に特異的に結合させ、二重鎖構造を形成させ、その発現、mRNAもしくは遺伝子DNAの機能、蛋白質への翻訳、もしくは細胞質内への輸送、もしくはその総体的生物学的機能に必要な任意の活性のうちのいずれかを塩基配列特異的に阻害する方法である。これにより、mRNAもしくは遺伝子DNAがその機能の全てもしくは一部分を実行できないために、蛋白質が正しく発現されるように調節するゲノムの一部分の欠損がもたらされ、このことにより遺伝子DNAから蛋白質への遺伝子情報の流れが遮断され、発現が負の方向へ調節され阻害される。アンチセンス法は、アンチセンス・オリゴヌクレオチドと同じ配列を有する遺伝子の発現を塩基配列特異的に阻害する。多大な数にのぼる最近の研究により、アンチセンス・オリゴヌクレオチドの有用性は、遺伝子の機能解析に優れた方法としても実証されている(Rothenberg et al., J. Natl. Cancer Inst. 1989, 81, 1539-1544, Zon, G. Pharmaceutical Res. 1988, 5, 539-549)。

アンチセンス・オリゴヌクレオチドは4つの塩基単位からなる長い鎖であるため、どのような標的遺伝子の塩基配列についても容易に合成することができる。オリゴヌクレオチド化学における最近の進歩により、また、ヌクレアーゼ耐性オ

リゴヌクレオチドやS-オリゴヌクレオチドなどの合成における最近の進歩により、現在では新規の形態の治療法としてのアンチセンス・オリゴヌクレオチドの利用を考案することが可能となっている。細胞は核酸を分解し得る種々のエキソ- およびエンド-ヌクレアーゼを含む。多数のヌクレオチドおよびヌクレオシド修飾が、これらを取り込んだオリゴヌクレオチドを天然のオリゴヌクレオチドよりヌクレアーゼ消化に対してより耐性とすることが示されている。このように修飾されたもしくは置換されたオリゴヌクレオチドはしばしば天然形態のものよりも好ましい。ヌクレアーゼ耐性は、オリゴヌクレオチドを細胞抽出物または単離ヌクレアーゼ溶液とともにインキュベートし、通常はゲル電気泳動により、時間に関して残存する無傷のオリゴヌクレオチドの程度を測定することによりルーチン的に測定される。ヌクレアーゼ耐性を増強するように修飾されているオリゴヌクレオチドは非修飾オリゴヌクレオチドより長く無傷のまま残る。ヌクレアーゼ耐性を増強または与えるための種々のオリゴヌクレオチド修飾が知られている。例えば、意図される幾つかの好ましいオリゴヌクレオチドの態様には、S-オリゴヌクレオチドなどのホスホロチオエート、ホスホトリエステル、ホスホン酸メチル、短鎖アルキル、もしくはシクロアルキル糖間結合、あるいは短鎖ヘテロ原子もしくは複素環式糖間結合を含むことができる。S-オリゴヌクレオチド（ヌクレオチドホスホロチオエート）は、オリゴヌクレオチド（O-オリゴ）のリン酸基の非橋酸素原子がイオウ原子により置換された等電アナログである。S-オリゴヌクレオチドは、対応するO-オリゴを、イオウ転移試薬である3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン-1, 1-ジオキシドで処理することにより得ることができる。J. Org. Chem. 第55巻、第4693-4698頁（1990年）に掲載のR. P. Iyer等の論文およびJ. Am. Chem. Soc. 第112巻、第1253-1254頁（1990年）に掲載のR. P. Iyer等の論文を参照されたい。モルホリノ主鎖構造を有するオリゴヌクレオチド（Summerton、J. E. およびWellier、D. D.、米国特許第5,034,506号）の態様も好ましい。他の好ましい態様においては、蛋白質-核酸（PNA）主鎖のような、オリゴヌクレオチドのホスホジエステル主鎖をポリアミド主鎖で置換することができる（P. E. Ni

eisen, M. Egholm, R. H. Berf, O. Buchardt, Science 1991, 254, 1497)。この場合、塩基はポリアミド主鎖のアザ窒素原子に直接もしくは間接的に結合している。オリゴヌクレオチドはペントフラノシル基の代わりにシクロブチルのような糖擬態物をも有することができる。さらに、オリゴヌクレオチドは典型的には、一つまたはそれ以上の有利な性質（例えば、ヌクレアーゼ耐性の増加、細胞内への取り込みの増加、RNA標的に対する結合親和性の増加）を与える少なくとも一つの修飾されたヌクレオチド領域およびRNase H切断のための基質である領域を含む。一つの好適な態様において、オリゴヌクレオチドは、標的結合親和性を増加させるために修飾された少なくとも一つの領域および通常はRNase Hのための基質として働く領域を含む。その標的（この場合、カゼインキナーゼ2をコードしている核酸）に対するオリゴヌクレオチドの親和性は、オリゴヌクレオチドと標的が解離する温度であるオリゴヌクレオチド／標的対の熱融解温度（ T_m ）を測定することによりルーチン的に決定される。また、解離は分光学的に検出される。熱融解温度（ T_m ）が高いほど標的に対するオリゴヌクレオチドの親和性は強い。より好適な態様では、カゼインキナーゼ2の mRNA 結合親和性を増加させるために修飾されたオリゴヌクレオチドの領域は、糖の2' 位が修飾された少なくとも一つのヌクレオチド（最も好適であるのは2' - O- アルキルまたは2' - フルオロ修飾ヌクレオチド）を含む。そのような修飾はオリゴヌクレオチド内ヘルチン的に組み込まれ、これらのオリゴヌクレオチドは与えられた標的に対し、2' - デオキシオリゴヌクレオチドより高い熱融解温度（ T_m ）（即ちより強い標的結合親和性）を有していることが示される。そのような増加した親和性の効果は、カゼインキナーゼ2に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドの効果を非常に増強する。RNase HはRNA : DNA デュプレックスのRNA鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼである。従って、この酵素の活性化はRNA標的の切断を生じ、アンチセンス阻害の効率を非常に促進する。RNA標的の切断はゲル電気泳動によりルーチン的に示すことができる。

オリゴヌクレオチドまたは類似体は、約12から約50個、好ましくは12～

25個、さらに好ましくは16～22個の塩基を含むことが好ましい。さらに、このようなオリゴヌクレオチドまたは類似体は、生理学的条件下（熱融解温度（ T_m ）では、実質上37℃より高く、好ましくは少なくとも50℃で、代表的には60℃～80℃またはそれ以上）で標的mRNA塩基配列に特異的に結合しハイブリダイズする。そのようなハイブリダイゼーションは好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件に対応し、この条件はイオン強度およびpHでの標的mRNA塩基配列の熱融解温度（ T_m ）より約10℃、そして好ましくは約5℃低く選択される。さらに、相補性（1つのポリペプチドが、別のポリペプチドに対して相補的である度合い）は、一般的に受け入れられる塩基対形成規則によって、お互いに水素結合を形成することが予測される相対する鎖の塩基の比率によって定量化できる。特異的にハイブリダイズ可能および相補的とは、DNAまたはRNA標的とオリゴヌクレオチドとの間で安定かつ特異的な結合が起こるように十分な程度の相補性を示すのに使用される術語である。特異的にハイブリダイズ可能であるには、オリゴヌクレオチドはその標的核酸配列と100%相補的である必要はないことを理解されたい。もっとも、100%相補的であることが特異性及び良好な翻訳阻害のために最も好ましい。100%相補的でない場合でも、相補性は90%以上（すなわち、mRNAにハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチド中の塩基のうち、対になるmRNAの塩基とミスマッチしている塩基の数が全アンチセンスオリゴヌクレオチド中の10%以下）であることが好ましい。標的へのオリゴヌクレオチドの結合が標的分子の正常な機能を妨害して有用性の消失を起こす場合、および特異的結合が望まれる条件下、たとえば治療的処置の場合には生理的条件下で、非標的配列へのオリゴヌクレオチドの非特異的結合を避けるために十分な程度の相補性がある場合、オリゴヌクレオチドは特異的にハイブリダイズ可能である。このようなオリゴヌクレオチドまたは類似体は、よく知られる技術である固相合成により簡便かつルーチンに作製することができる。オリゴヌクレオチドの化学合成の検討については、バイオコンジュゲイト・ケミストリー(Bioconjugate Chemistry)第1巻、第165～167頁（1990年）に掲載のグッドチャイルド(Goodchild)の論文を参照さ

りたい。たとえば、オリゴヌクレオチドは、ヨウ素による酸化を行う標準ホスホ
ロアミダイト化学を用いて自動化DNA合成機（アプライドバイオシステムズ
モデル380B）で合成され、このような合成のための装置はアプライドバイオ
システムズを含む数々の販売元により販売されている。このようなオリゴヌクレ
5 オチドまたは類似体の合成は、日常作業者の技術の範囲内で十分に行われる。あ
るいは、アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの合成を専
門的に行なっている数多くの企業から得ることができる。ホスホロチオエートお
よびアルキル化誘導体のような他のオリゴヌクレオチドを調製するための同様な
技術の使用もよく知られている。また、蛍光標識、ビオチニル化またはコレステ
10 ロール修飾オリゴヌクレオチドのような他の修飾オリゴヌクレオチドを合成する
ために、同様の技術およびビオチン、フルオレセイン、アクリジンまたはソーラ
レン修飾アミダイトおよび／または制御細孔ガラス（CPG）（Glen Research, Sterling VA）のような市販品として入手可能な修飾
アミダイトおよびCPG産物の使用もよく知られている。

15 アンチセンス法は、疾患原因遺伝子あるいは疾患関連遺伝子自体を標的にして
いるので原因療法に近い方法であり、アンチセンス・オリゴヌクレオチドには多
くの疾患の治療のための治療剤としての偉大な可能性が存在している。例えば、
米国特許第5135917号はヒトインターロイキン-1レセプター発現を阻害
するアンチセンス・オリゴヌクレオチドを提供している。米国特許第50988
20 90号はc-myc癌遺伝子と相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドおよ
びある種の癌状態のアンチセンス・オリゴヌクレオチド治療に関する。米国
特許第5087617号はアンチセンス・オリゴヌクレオチドによる癌患者の処
置法を提供している。米国特許第5166195号はHIVのオリゴヌクレオチ
ド阻害剤を提供している。米国特許第5004810号は単純ヘルペスウイルス
25 Vmw65mRNAにハイブリダイズして複製を阻害するオリゴマーを提供し
ている。米国特許第5194428号はインフルエンザウイルスに対して抗ウイル
ス活性を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチドを提供している。米国特許
第4806463号はアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびHTLV-III複

製の阻害にそれらを用いる方法を提供している。米国特許第5286717号は癌遺伝子に相補的な混合結合オリゴヌクレオチドホスホロチオエートに関している。米国特許第5276019号および第5264423号は細胞における外来性核酸の複製阻害に使用されるホスホロチオエートオリゴヌクレオチド類似体に関する。ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチドはAIDS患者のサイトメガロウイルス網膜炎に対して有効であることが示されている（BioWorld Today、1994年）。従って、オリゴヌクレオチドは有用な治療手段であり、細胞および動物（特にヒト）の処置のための処置養生法で有用であろうことは確立されている。カゼインキナーゼ2の発現の阻害もまた、腎疾患の治療に極めて有用である。

カゼインキナーゼ2のcDNA配列は公知である（例えば、ヒトカゼインキナーゼ2 α サブユニットのcDNA配列がGenBank Accession No. J02853、ヒトカゼインキナーゼ2 α' サブユニットのcDNA配列がGenBank Accession No. M55268、ヒトカゼインキナーゼ2 β サブユニットのcDNA配列がGenBank Accession No. AY113186、ラットカゼインキナーゼ2 β サブユニットのcDNA配列がGenBank Accession No. NM_031021、ラットカゼインキナーゼ2 α サブユニットのcDNA配列がGenBank Accession No. L15618、マウスカゼインキナーゼ2 α サブユニットのcDNA配列がGenBank Accession No. AJ001420、マウスカゼインキナーゼ2 β サブユニットのcDNA配列がGenBank Accession No. NM_009975に記載されている。これらのうち、ヒトカゼインキナーゼ2 α サブユニット、同 α' サブユニット、同 β サブユニット、ラットカゼインキナーゼ2 α サブユニット及び β サブユニットのcDNA配列をそれぞれ配列番号15ないし19に示す）ので、カゼインキナーゼ2遺伝子から転写されたmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは容易に合成することができる。

すなわち、これらのcDNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドは、基本的にアンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いることができる。もっとも、選択した塩基配列が標的遺伝子に対して特異的である（すなわち、該標的遺伝子以外の遺伝子中には、該塩基配列又はそれと相同性が高い塩基

配列が存在しない) ことをBLAST検索等により確認することが好ましい。具体例としては、ラットのカゼインキナーゼ2 α サブユニット (α' サブユニットを含め) のアンチセンス・オリゴヌクレオチドとして 5'-gtaatcatcttgattacccca-3' (配列番号1)、ラットのカゼインキナーゼ2 β サブユニットのアンチセンス・オリゴヌクレオチドとして 5'-ggttggccggccgcttgggcc-3' (配列番号2) を用いることができる。その他、配列番号3~10に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドも例示することができる。さらに、カゼインキナーゼ2のmRNAにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは種々公知であり(例えば、WO出願020/62951号およびWO出願020/62954号)、これらの公知のオリゴヌクレオチドを用いることもできる。動物種を越えて対応する塩基配列、またはその部分から成るオリゴヌクレオチドまたは類似体もまた本発明において有用である。mRNAのコーディング領域だけでなく、5'—非翻訳領域、3'—非翻訳領域、5'キャップおよびイントロン/エクソン結合部位のような領域もアンチセンスオリゴヌクレオチドの標的領域として利用することが可能である。

すなわち、本発明により調製されるオリゴヌクレオチドおよび類似体は、コーディング領域と同様にこれらの領域の全部または部分を標的とすることができる。好適な態様によれば、オリゴヌクレオチドまたは類似体は転写開始部位、翻訳開始部位、3'—非翻訳領域中のイントロン/エクソン結合部位または塩基配列と特異的にハイブリダイズできる。妨害されるべきmRNAの機能には、蛋白質翻訳の部位へのmRNAのトランスロケーション、mRNAからの実際の蛋白質の翻訳、mRNAのスプライシングまたは成熟およびおそらくはmRNAにより行われているであろう独立した酵素活性のような生存のためのすべての機能が含まれる。mRNA機能のそのような妨害の全体的な効果はカゼインキナーゼ2の蛋白質の発現の妨害を起こすことである。このようにアンチセンス・オリゴヌクレオチドまたは類似体は、少なくともカゼインキナーゼ2の蛋白質をコードするmRNAと塩基配列特異的にハイブリダイズでき、カゼインキナーゼ2の発現を選択的に変調し得るオリゴヌクレオチドまたは類似体である。またカゼインキナーゼ2のアンチセンス・オリゴヌクレオチドまたは類似体を細胞や個体に投与

すれば、塩基配列特異的にカゼインキナーゼ2の発現だけを選択的に阻害することができ、それゆえに腎疾患を治療することができる。本発明に用いられるカゼインキナーゼ2のアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、カゼインキナーゼ2をコードするmRNAのコーディング領域、3'非翻訳領域、5'非翻訳領域、5'キャップおよびまたはイントロン／エキソン結合部位に対して相補性を有するとともにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドである。この領域に対して相補性を有するオリゴヌクレオチドを使用すると、カゼインキナーゼ2に対して選択的にハイブリダイズする。好ましくは、ヌクレオチド中の少なくとも一つの結合基がイオウ含有基あるいはホスホロチオエート部分を含む、S-オリゴヌクレオチドである。本発明に更に包含されるものとして、有効量の本発明のカゼインキナーゼ2のアンチセンス・オリゴヌクレオチドの少なくとも1つを、薬学的に許容することができるキャリアと組み合わせてなる薬剤組成物がある。カゼインキナーゼ2のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを投与することにより、カゼインキナーゼ2の発現を抑制することができるので、腎疾患を治療することができる。特に、カゼインキナーゼ2の発現が亢進していることを特徴とする腎疾患、たとえば腎炎に対しては実に好適である。下記実施例にも一例が詳細に記載されている。

RNAi (RNA干渉) 法とは、細胞や個体に投与された2本鎖RNAが、それと同じ配列を持つ遺伝子の発現(蛋白質の合成)を阻害する現象による方法のことである。RNAi法は、標的遺伝子またはmRNAを破壊することで標的遺伝子の発現を選択的に抑制するため、その遺伝子の機能解析に有効な方法として、また、疾患原因遺伝子あるいは疾患関連遺伝子自体を標的にしているので原因療法に近い方法としても注目されている。RNAiで使用する21～23核酸塩基単位の二本鎖RNAは、siRNAとも呼ばれる。siRNAは、容易に設計できる。たとえば、転写因子の結合部位を避けるため、翻訳領域でスタートコドンから50塩基以上下流の最初のAA、CA、GA、TAを見つけ、それに続く19～21塩基を含めた21～23塩基を選択する。なお、選択した塩基配列は、GCコンテンツが30～70%、望ましくは50%、GGGまたはCCCのパタ

ーンを含まないものが望ましい。ついで、選択した塩基配列が目的遺伝子に対して特異的であることをBLAST検索等により確認すればよい。siRNAもまた4つの塩基単位からなる長い鎖であるため、どのような標的遺伝子の塩基配列についても簡便かつ日常的に合成することができる。最近の進歩により、現在では新規の形態の治療法としてのsiRNAの利用を考案することが可能となつてきている。具体的には、ヒトのカゼインキナーゼ2 β サブユニットのsiRNAとして、例えば、5'-cuaccgacaagcucuagactt-3' および 5'-gucuagagcuugucgguagtt-3' を用いることができる。あるいは、例えば 5'-cuaccgacaagcucuagacat-3' および 5'-gucuagagcuugucgguagtg-3' を用いることができる。ラットは、例えば 5'-auuuacuggacucaaugatt-3' および 5'-gauggcuguucgagaucugtt-3' を用いることができる。あるいは当業者がカゼインキナーゼ2の発現の阻害のための好ましいsiRNA知識から調製することができる任意の同様なオリゴヌクレオチドまたは類似体を利用することが好ましい。これらのsiRNAを細胞や個体に投与すれば、塩基配列特異的にカゼインキナーゼ2の発現だけを選択的に阻害することができ、それゆえに腎疾患を治療することができる。とくに、カゼインキナーゼ2の発現が亢進していることを特徴とする腎疾患、たとえば腎炎に対しては実に好適である。

カゼインキナーゼ2を阻害するこれらの核酸は、薬剤学的組成物中に調剤することができ、この薬剤学的組成物はこれらの核酸の他に、担体、増粘剤、賦形剤、緩衝液、保存料、界面活性剤、リポソーム、もしくは脂質製剤などを含むことができ、抗生物質および麻酔剤などのような一つもしくは複数の活性成分をも含むことができる。そのような医薬担体に加えて、オリゴヌクレオチドの取り込みを容易にするためにカチオン性液体や、リポソームの形態をなすことができる親油性陽イオン性化合物が処方に含まれていてもよい。取り込みを容易にするそのような組成物の一つはリポフェクテン(BRL, Bethesda MD)である。オリゴヌクレオチドを細胞内に導入するのにリポソームを使用することは、例えば、米国特許第 4,897,355 号および同第 4,394,448 号に教示されている。更に、生物学的物質からなるリポソームをつくる一般的な方法に関しては、米国特許第

4, 235, 871 号、同第 4, 231, 877 号、同第 4, 224, 179 号、同第 4, 753, 788 号、同第 4, 673, 567 号、同第 4, 247, 411 号および同第 4, 814, 270 号を参照されたい。

あるいは、オリゴヌクレオチドは、コレステロール、コール酸およびデオキシコール酸をはじめとする数多くのステロールのうちのいずれか 1 つのような親油性

5 キヤリヤと組み合わせることができる。好ましいステロールは、コレステロールである。更に、オリゴヌクレオチドは、細胞によって摂取されるペプチドに結合させることができる。有効なペプチドには、例えば、ペプチドホルモン、抗原または抗体およびペプチドトキシンがある。腎臓を構成する細胞により選択的に取り込まれるペプチドを選択することにより、オリゴヌクレオチドの特定の給送を

10 効果的に行なうことができる。オリゴヌクレオチドは、活性化されたアミノアルキル誘導体の形成により、5' OH 基を介して共有結合させることができる。選択されたペプチドは、次に、アミノおよびスルフヒドリル反応性ヘテロニ官能価試薬を用いて活性化されたオリゴヌクレオチドに共有結合させることができる。

後者は、ペプチドに存在するシステイン残基に結合する。細胞をペプチドに結合

15 したオリゴヌクレオチドに曝すと、ペプチジルアンチセンス剤がエンドサイトシス化され、オリゴヌクレオチドは標的 mRNA に結合して翻訳を抑制する。PCT/US 89/02363 号 PCT 出願公報を参照されたい。投与用量は処置されるべき状態の重度および応答度に依存し、処置進行は治療が達成されるかまたは疾患状態の軽減が達成されるまで数日から数カ月続く。至適投与計画は体内の

20 薬剤蓄積の測定から計算しうる。当業者は容易に至適投与量、投与法および繰り返し頻度を決定しうる。至適投与量は個々のオリゴヌクレオチドの相対的有効性に依存して変化するであろうが、一般的には動物実験からの EC₅₀ に基づいて計算しうる。例えば、化合物の分子量（オリゴヌクレオチド配列および化学構造から導かれる）および IC₅₀ のような有効量（実験的に求められる）が与えら

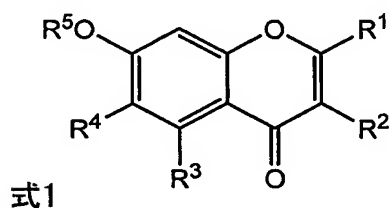
25 れると、mg/kg での投与量がルーチン的に計算される。多数の刊行物が哺乳動物への遺伝子の投与に関連している。リポソームを介した遺伝子の注入および組織への直接的な遺伝子の注入の例にはブリガムら（1989）Am. J. Med. Sci., 298:278-281, ナーベルら（1990）Science, 249:1285-1288, ハジンスキら（1991

) Am. J. Resp. Cell Molec. Biol., 4:206- 209;ワンとホアン (1987)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 84:7815- 7855 がある。ヒト遺伝子治療手法の総説記事の例には、アンダーソン、Science (1992) 256:808- 813 がある。

オリゴヌクレオチドの投与量は、上記のように適宜設定されるが、通常、オリ
5 ゴヌクレオチドの重量換算で1日当り 0.005 mg/kg~5 mg/kg 程度が適当な場合
が多い。また、投与経路は、好ましくは非経口投与であり、静脈内投与、筋肉内
投与、皮下投与等を例示することができる。

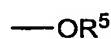
カゼインキナーゼ2を阻害する物質のうち、その酵素活性を阻害する物質とし
ては、カゼインキナーゼ2の活性を少なくとも部分的に中和する抗カゼインキナ
10 ーゼ2抗体又はその抗原結合性断片も用いることができる。抗カゼインキナーゼ
2抗体は、カゼインキナーゼ2の各サブユニットの蛋白質またはカゼインキナー
ゼ2蛋白質の部分ペプチドを抗原とするモノクローナル抗体および/若しくはポ
リクローナル抗体又は抗体の抗原結合性断片であり、カゼインキナーゼ2の活性
を少なくとも部分的に中和できる限り、特に制限はなく、カゼインキナーゼ2や
15 そのサブユニットを抗原とし常法に従って作製できる。中和活性を有するポリク
ローナル抗体は、カゼインキナーゼ2を免疫原として得られた抗血清から常法に
より回収することができる。また、中和活性を有するモノクローナル抗体は、カ
ゼインキナーゼ2やそのサブユニットを抗原として用いる常法によりモノクロー
ナル抗体を作製し、カゼインキナーゼ2の中和活性を有するものをスクリーニン
20 グすることにより得ることができる。抗カゼインキナーゼ2抗体は、細胞によ
って摂取されるペプチドに結合させることができる。上述のように有効なペプチド
には、例えば、ペプチドホルモン、抗原または抗体およびペプチドトキシンがあ
る。腎臓を構成する細胞により選択的に取り込まれるペプチドを選択することに
より、抗カゼインキナーゼ2抗体の特定の給送を効果的に行なうことができる。
25 これらの抗カゼインキナーゼ2抗体もまた細胞や個体に投与すれば、抗体、抗原
特異的にカゼインキナーゼ2の活性だけを選択的に阻害することができ、それゆ
えに腎疾患を治療することができる。とくに、カゼインキナーゼ2の活性が亢進
していることを特徴とする腎疾患、たとえば腎炎に対しては実に好適である。

カゼインキナーゼ2を阻害する物質のうち、その酵素活性を阻害する物質の好ましい例としては、さらに、下記式1で示される構造を有する化合物を挙げることができる。



- 5 (但し式1中、 R^1 、 R^2 はそれぞれ独立に水素原子、水酸基、または式2に表される置換基から選ばれる1種乃至は2種以上を有していても良いフェニル基を表し、且つ、 R^1 、 R^2 の少なくとも一方は該置換基を有していても良いフェニル基であり、 R^3 、 R^4 はそれぞれ独立に水素原子又は式2に表される置換基を表し、 R^5 は水素原子、糖残基、C1~4アルキル基又はアシル基を表す。)

10



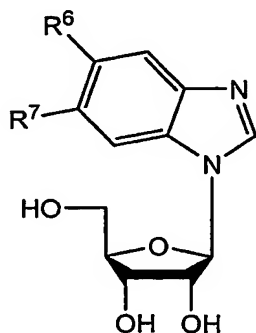
式2

(但し、式中 R^5 は式2の R^5 と同じ意味を表す)。

15

式1について糖残基として好ましくはグルコース、ガラクトース、リボースが挙げられ、C1~4アルキルとして好ましくはメチル、エチルが挙げられ、アシルとして好ましくはアセチルのようなC1~C4アシル及びベンゾイルが挙げられる。

カゼインキナーゼ2を阻害する物質のうち、その酵素活性を阻害する物質の好ましい例としては、さらに、以下の化合物を挙げることができる。



式3

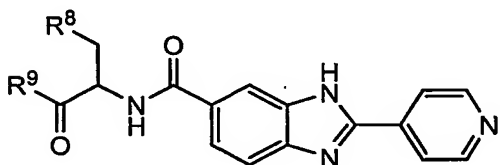
(但し式 3 中、 R^6 、 R^7 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子又は C1~4 アルキル基である。)

4, 5, 6, 7-テトラブロモベンズイミダゾールである TBB (Sarno S, FEBS Letters 2001 469:44-48)、5, 6-ジブromo-1- (β -D-リボフラノシル

5) ベンズイミダゾールである DRB (Meggio F, Eur. J. Biochem 1990 187:89-94)、

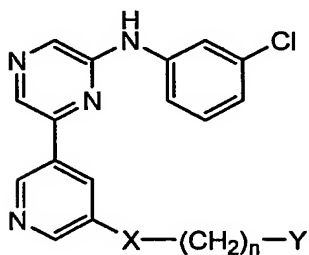


で示される構造を有する化合物、



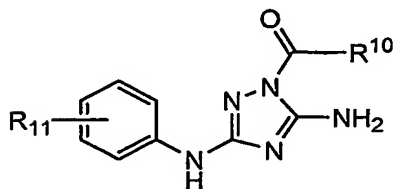
式 4

10 (但し、式 4 中、 R^8 は、1~3 個のハロゲン、メチル基、トリフルオロメチル基若しくは水酸基で置換されても良いフェニル基、またはキノリル基、エチルメチルスルヒド基、 t -ブチルフェニルチオ基、 N -エチルフェニルアミノ基であり、 R^9 は、水酸基、またはアミノ基を表す)



15 式 5

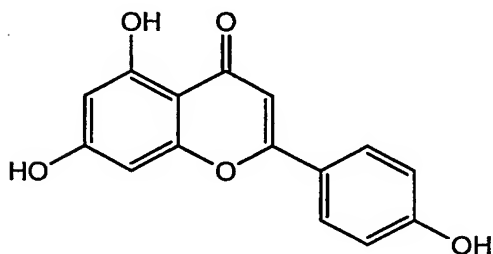
(但し、式 5 中、 n は、1~3、 X は、 $-NH-$ 又は $-CONH-$ であり、 Y は、水酸基、ピペリジン、ピロリジン、ピペラジン、ピラゾール又はトリアゾールを表す)



式6

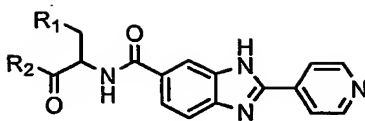
(但し、式6中、 R^{10} は、ハロゲン、メチル基、エチル基若しくはt-ブチル基で置換されてもよい2-チエニル基若しくはフェニル基であり、 R^{11} は、 $-SO_2-NH_2$ 、 $-SO_2-NHMe$ 又は $-SO_2-NH[(CH_2)_2N(CH_3)_2]$ を表す)。

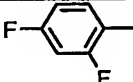
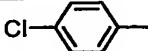

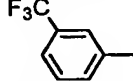
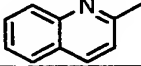
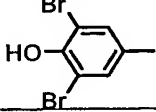
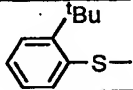
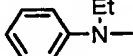
- 5 上記一般式に含まれる化合物の好ましい例として、下記式7で表されるアピゲニンを挙げることができる。アピゲニンは、上記の酵素活性測定法によって決定されるカゼインキナーゼ2の機能的活性を $10\mu M$ の濃度で約25%阻害し、 $100\mu M$ の濃度で約75%阻害、減少させるものであり好ましい。

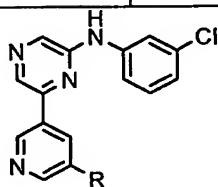


10 式7

さらに、上記した各一般式に含まれる化合物のうち、特に好ましい化合物として下記の化合物を具体的に例示することができる。

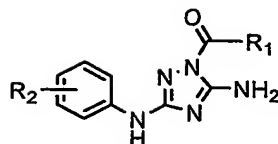


R1	R2
	-OH
	-OH
	-OH
	-OH
	-NH ₂
	-NH ₂
-CH ₂ CH ₂ SM _e	-NH ₂
	-OH
	-OH



5

R
-CONHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH
-NH CH ₂ CH ₂ CH ₂ - (1-ピペリジン)
-NH CH ₂ CH ₂ CH ₂ - (1-ピラゾール)
-NH CH ₂ CH ₂ CH ₂ - (1, 2, 4-トリアゾール)



R1	R2
2-チエニル	4-SO ₂ -NH ₂
(3-Cl)-2-チエニル	4-SO ₂ -NH ₂
3-チエニル	4-SO ₂ -NH ₂
(5-Et)-2-チエニル	4-SO ₂ -NH ₂
5-[C(CH ₃) ₃]-2-チエニル	4-SO ₂ -NH ₂
(5-Et)-2-チエニル	4-SO ₂ -NHMe
(5-Et)-2-チエニル	4-SO ₂ -NH[(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂]

これらの化合物自体、その製造方法及びそれらがカゼインキナーゼ 2 の酵素活性の阻害効果を有することは公知であり、例えば米国特許第 6, 358, 978 号、PCT 公開番号 W001/42231, PCT 公開番号 W0 02/24681, PCT 公開番号 W0 02/057240 等に記載されている。従って、これらの化合物は公知に方法に従って容易に製造することができる。

なお、カゼインキナーゼ 2 の酵素活性を阻害する物質は上記した化合物に限定されるものではなく、カゼインキナーゼ 2 の酵素活性を阻害することが知られている他の化合物も用いることが可能である。

上記した種々のカゼインキナーゼ 2 を阻害する物質は、薬剤上許容できる塩の形態にあってもよい。これらはよく知られた塩基または酸付加塩のいずれかである。塩基性塩の例は水酸化アンモニウムおよびアルカリおよびアルカリ土類金属水酸化物、炭酸塩および重炭酸塩から誘導されるものならびに脂肪族および芳香族アミン、脂肪族ジアミンおよびヒドロキシアシルアミンから誘導される塩である。このような塩の調製に特に有用な塩基には、水酸化アンモニウム、炭酸カリウム、重炭酸ナトリウム、水酸化リチウム、水酸化カルシウム、メチルアミン、ジエチルアミン、エチレンジアミン、シクロヘキシルアミンおよびエタノールアミンが含まれる。カリウム、ナトリウムおよびリチウム塩形が特に好ましい。酸付加塩は、適当な酸との薬剤上許容されうる非毒性の付加塩、たとえば無機酸た

たとえば塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸もしくはリン酸または有機酸たとえば有機カルボン酸、たとえばグリコール酸、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、サリチル酸もしくは *o*-アセトキシ安息香酸、または有機スルホン酸、たとえばメタンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、*p*-トルエンスルホン酸もしくはナフタレン-2-スルホン酸との塩が好ましい。

これらのカゼインキナーゼ2の酵素活性阻害化合物はそれぞれ単独で用いられるほか、2種類以上の化合物を混合して用いても良い。

本発明において、カゼインキナーゼ2の酵素活性阻害化合物を有効成分とする腎疾患の治療もしくは予防剤を動物あるいはヒトに投与する場合には、経口、静脈内、筋肉内、皮下、腎臓組織内などいずれの投与形態を用いてもよい。投与に際しては、それぞれの投与方法に適した剤型に調製することができる。本発明の腎疾患治療あるいは予防剤の剤型としては、注射剤、舌下剤、経皮パッチ剤、錠剤、カプセル剤、細粒剤、顆粒剤、散剤、丸剤、トローチ錠、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、座薬、軟膏剤、点眼剤等が挙げられる。剤型に応じて、製剤上許容される賦形剤、例えば、乳糖、バレイショデンプン、炭酸カルシウム、又はアルギン酸ナトリウム等を配剤してもよい。さらに、通常製剤に用いるその他の材料、例えば血清アルブミン等の蛋白質、緩衝作用、浸透圧調整のための塩、担体、賦型剤、基剤、溶解補助剤、分散剤、安定化剤、酸化防止剤、保存剤、崩壊剤、結合剤、矯味剤、滑沢剤、コーティング剤、着色剤等々の成分を配合しても良い。

投与量は、投与方法や対象とする人間をはじめとする温血動物の種類、個体の年齢、体重、症状の軽重、医師の診断などにより広範に変えることができるが、通常、体重1kg当たり1日に0.001~100mg/kg体重の範囲で設定される。しかし、患者の症状の軽重、医師の診断に応じて投薬範囲を変えることも可能である。上記投与量は1日1回又は数回に分けて投与することができる。上記の遺伝子治療の場合には、その安全性を含めて、NIHのガイドラインを参考にして実施することができる(Recombinant DNA Advisory Committee, Human Gene Therapy、4、365-389(1993))。本発明の腎疾患治療剤または予防剤は、文字通り腎疾患の治療又は予防を目的として使用できることは勿論であるが、腎

疾患の、維持（悪化防止）、軽減（症状の改善）等を目的として投与することもできる。さらに本発明は、カゼインキナーゼ2を阻害する物質を用いた腎疾患の治療方法を含む。

また本発明の腎疾患の治療又は予防剤は、従来の腎疾患治療に用いられるステロイド、免疫抑制剤、降圧剤（例：カルシウムブロッカー、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、A T I I レセプターブロッカー、 α 受容体遮断薬）、抗血小板薬（例：ジピリダモール、ジラゼップ）、抗凝固薬、などの薬剤と併用して用いることができる。またHGFなどを導入することによる遺伝子治療と組み合わせて用いることができる。これらの薬剤を組み合わせる場合、各薬物を別々にあるいは同時に、薬理的に許容されうる担体、賦形剤、結合剤、希釈剤などと混合して製剤化し、医薬組成物として経口的にまたは非経口的に投与することができる。薬物を別々に製剤化した場合、別々に製剤化したものを使用時に希釈剤などを用いて混合して投与することができるが、別々に製剤化した個々の製剤を、同時に、あるいは時間差をおいて別々に、同一対象に投与してもよい。

上記の通り、本願発明者らは、腎疾患状態にある腎細胞中でのカゼインキナーゼ2遺伝子の発現量が、正常な腎細胞中における発現量よりも有意に多くなっていることを見出した。従って、本発明は、生体から分離した試料中のカゼインキナーゼ2の活性若しくは含有量又はカゼインキナーゼ2遺伝子の発現量を測定することを含む、腎疾患の診断方法をも提供する。ここで、「生体から分離した試料」は、腎臓を構成する細胞が好ましい。

カゼインキナーゼ2の発現を指標とする腎疾患の診断方法は、カゼインキナーゼ2の α サブユニット、 α' サブユニットおよび β サブユニットの発現、特に遺伝子の発現、蛋白質の発現および酵素活性の発現を対象に実施することができる。例えば、遺伝子あるいは蛋白質の発現を対象に実施する場合では、まず、診断対象とする腎臓およびその対照とする非腎疾患状態の腎臓からRNAもしくは蛋白質をそれぞれ抽出する。抽出した各RNAもしくは蛋白質の一定量ずつを検体として、カゼインキナーゼ2の発現をそれぞれ検出する。診断対象とする腎臓でのカゼインキナーゼ2の発現と、その対照（健常人）とする非腎疾患状態の腎臓で

のカゼインキナーゼ2の発現を比較することにより、診断対象とする腎臓における腎疾患状態を診断できる。診断対象とする腎臓でのカゼインキナーゼ2の発現が、その対照とする非腎疾患状態の腎臓でのカゼインキナーゼ2の発現よりも高い場合には、診断対象とする腎臓は腎疾患状態にあり、特にカゼインキナーゼ2
5 が関与する腎疾患状態と診断される。このような検出系を用いて、腎臓の組織あるいは細胞中のカゼインキナーゼ2の発現を測定することによって腎疾患程度を正確に測定することが可能である。

カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現は、R T-PCR法 (Polymerase chain reaction method) (「PCR Protocols」 Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ eds., Academic Press, San Diego (1990))、ノーザンブロット法 (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1989))、アレイ法、DNAチップ法、in situ ハイブリダイゼーション法、in situ R T-PCR (Nucl. Acids Res., 21, 3159-3166 (1993)) などを利用して測定することができる。これらの方法自体は、いずれも周知のものであり、上記の通り、カゼインキナーゼ2のcDNA配列も公知であるから、当業者であれば、細胞中のカゼインキナーゼ2の遺伝子の発現の測定は容易に行うことができるし、下記実施例にも一例が
15 詳細に記載されている。R T-PCR法による測定はより好ましく用いられる。すなわち、抽出した各RNAの一定量ずつより、逆転写反応を用いてcDNAをそれぞれ合成する。合成した各cDNAの一定量ずつを鋳型にして、カゼインキナーゼ2のプライマーを用いてPCR法を行い、これらをそれぞれ増幅する。増幅した各PCR産物の一定量ずつをアガロースゲル電気泳動した後、エチジウム
20 ブロマイド染色を行い、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現をそれぞれ検出する。なお、カゼインキナーゼ2の遺伝子に関してPCRを行う際には、恒常的に発現している遺伝子 (例えばG3PDHや β アクチンなどのハウスキーピング遺伝子)
25) を内部標準として同様にPCR法を行い、そのPCR産物の一定量をアガロースゲル電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色を行って遺伝子の発現を検出し、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現の検出結果を補正するとよい。これらはいずれも常法である。上記で得られる各PCR産物は、常法、例えばジデオキシ

法 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74, 5463 (1977)) やマキシムーギルバート法 (Methods in Enzymology, 65, 499 (1980)) などに従って、また簡便には市販のシーケンスキットなどを用いて、その塩基配列情報を確認するとよい。

カゼインキナーゼ2の遺伝子のPCRに用いるプライマーは、カゼインキナーゼ2の各サブユニットの遺伝子のみを特異的に増幅できる特有のものである限り、特に制限はなく、これら遺伝子の完全長cDNAの公知(上述)の塩基配列情報をもとに適宜設定できる。すなわち、センスプライマーとしては、カゼインキナーゼ2のcDNAのセンス鎖と同一の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いることができ、また、アンチセンスプライマーとしては、カゼインキナーゼ2のcDNAのアンチセンス鎖と同一の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いることができる。センスプライマーとアンチセンスプライマーとで挟まれる領域がPCRにより増幅される。また、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドは、市販の化学合成機を用いて、常法に従って合成できる。プライマーのサイズは、特に限定されないが、通常、15~30塩基程度である。例えば、ラットのカゼインキナーゼ2 β サブユニットのプライマーの場合では、センス・プライマー; 5'-ccgcggacataaagatgagt-3 (配列番号11)、アンチセンス・プライマー; 5'-aaaccagtgccgaagtatgc-3' (配列番号12)を用いることができる。ラットのカゼインキナーゼ2 α サブユニットのプライマーの場合では、センス・プライマー; 5'-agaaagcttcggctaataga-3' (配列番号13)、アンチセンス・プライマー; 5'-actgaagaaatccctgacat-3' (配列番号14)を用いることができる。このようにして、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現を特異的にかつ簡便に検出することができる。あるいは、クエンチャー蛍光色素とレポーター蛍光色素を用いたいわゆるリアルタイム検出PCRのような定量的PCRも採用することができる。リアルタイム検出PCRも周知であり、そのためのキットも市販されているので、容易に実施することができる。

また、本発明のオリゴヌクレオチドはまた、プローブとして用いることもでき、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現の検出および診断に有用である。例えば、上

記したノーザンブロット法、アレイ法、DNAチップ法、in situハイブリダイゼーション法等におけるプローブとして利用できる。これらの手法自体は周知であり、当業者が容易に実施可能である。上記オリゴヌクレオチドに蛍光標識、放射標識、ビオチン標識等の標識を付した標識プローブを用いることができる。被
5 検核酸又はその増幅物を固相化し、標識プローブとハイブリダイズさせ、洗浄後、固相に結合された標識を測定することにより、検体中に被検核酸が存在するか否かを調べることができる。あるいは、測定用核酸を固相化し、被検核酸をハイブリダイズさせ、固相に結合した被検核酸を標識プローブ等で検出することも可能である。このような場合、固相に結合した測定用核酸もプローブと呼ばれる。な
10 お、核酸プローブを用いた被検核酸の測定方法もこの分野において周知であり、緩衝液中、核酸プローブを被検核酸と T_m 又はその近傍(好ましくは $\pm 4^\circ\text{C}$ 以内)で接触させることによりハイブリダイズさせ、洗浄後、ハイブリダイズした標識プローブ又は固相プローブに結合された鋳型核酸を測定することにより行うことができる。このような方法には、上記したノーザンブロットやインサイチューハイブリダイゼーション、さらにはサザンブロット法等の周知の方法が包含される。

例えば、ポリヌクレオチドキナーゼによる5'末端の ^{32}P 標識により放射性標識オリゴヌクレオチドを製造しうる。Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989,
20 第2巻, p10. 59。次に、放射性標識オリゴヌクレオチドを組織または細胞試料と接触させ、試料を洗浄して非結合オリゴヌクレオチドを除去する。試料に残存している放射活性は結合されたオリゴヌクレオチドを示しており(それはカゼインキナーゼ2の発現を示している)、シンチレーションカウンターまたは他の通常的手段により定量しうる。放射性標識オリゴを用いて組織のオートラジオ
25 グラフィーを実施し、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現の局在化、分布または量を決定することができる。また、組織切片を放射性標識オリゴヌクレオチドで処理し、上記のように洗浄し、次にルーチンオートラジオグラフィー法に従って写真乳化剤へ暴露する。現像すると乳化剤はカゼインキナーゼ2の遺伝子を発現

している範囲に銀粒子のイメージを与える。銀粒子の定量によりカゼインキナーゼ2の発現を検出することができる。カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現の蛍光検出のための類似のアッセイは、放射性標識の代わりにフルオレセインまたは他の蛍光性標識とコンジュゲートさせた本発明のオリゴヌクレオチドを用いて開発することができる。各々のこれらの様式は本分野では既知である。当業者は本発明の技術に従って容易にこれらの既知の様式をカゼインキナーゼ2の遺伝子の発現の検出に適用でき、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現を検出する新規かつ有用な手段が提供される。

また、カゼインキナーゼ2の蛋白質の発現を指標とする場合では、例えば上記カゼインキナーゼ2の各サブユニットの蛋白質またはカゼインキナーゼ2蛋白質の部分ペプチドを抗原とするモノクローナル抗体および／またはポリクローナル抗体もしくはその抗体の抗原結合性断片を用いて、酵素結合イムノソルベントアッセイ(エライザ、ELISA)、放射線免疫検定法(ラジオイムノアッセイ、RIA)、および酵素免疫法(エンザイムイムノアッセイ、EIA)、ウエスタンブロット解析法、ドットブロット解析法、プロテインチップ解析法、免疫染色解析法などを利用して、カゼインキナーゼ2の蛋白質またはカゼインキナーゼ2蛋白質の部分ペプチドを検出する。カゼインキナーゼ2の蛋白質の検出に用いる抗体もしくは抗体の部分は、カゼインキナーゼ2の各サブユニットの蛋白質またはカゼインキナーゼ2蛋白質の部分のみを特異的に検出できる特有のものである限り、特に制限はない。ポリクローナル抗体はウサギ、ラット、マウス、ヤギなどにカゼインキナーゼ2蛋白質のそれら抗原を静脈、皮下、筋肉中など非経口的に投与することによって得られる。モノクローナル抗体は例えば、カゼインキナーゼ2蛋白質のそれら抗原を非経口的に投与したマウスの脾臓細胞を摘出し、マウスミエローマ(骨肉腫)細胞と細胞融合した後培養して得られる培養上清を精製する、など通常の方法で得ることができる。また、カゼインキナーゼ2自体も公知の方法により容易に調製できる。例えば、ラット、ウシなどの哺乳動物の腎臓、肝臓、脾臓、肺臓、骨髓、脳、胎盤などの臓器及び血液細胞などから抽出、精製して得ることができる。また、カゼインキナーゼ2を産生する初代培養細胞や株化細胞

を培養し、細胞から分離精製してカゼインキナーゼ2を得ることもできる。あるいは公知の遺伝子工学的手法によりカゼインキナーゼ2をコードする遺伝子を大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物または動物細胞等適切な宿主細胞に組み込み、この形質転換体の培養物から目的とする組換えカゼインキナーゼ2を得ることができるので、容易に実施することができる。また、上記した各種免疫測定方法やその他の解析法自体は周知であり、例えば、酵素結合イムノソルベントアッセイでは、ポリスチレン製のマイクロプレートに抗カゼインキナーゼ2抗体を結合させたものに被検検体を注入し、一定時間反応後洗浄し、パーオキシターゼなどで酵素標識した抗カゼインキナーゼ2抗体を添加し再洗浄した後、過酸化水素などの基質およびOPD（オルトフェニレンジアミン）などの発色剤を加えて発色させる方法がある。また、免疫染色解析法により組織中のカゼインキナーゼ2を検出する方法は、摘出した組織切片にFITC（フルオレッセンスーイソチアネート）などの蛍光物質で標識した抗カゼインキナーゼ2抗体、もしくはパーオキシターゼなどで酵素標識した抗カゼインキナーゼ2抗体で染色することができる。本発明はこれらの検出系を用いてカゼインキナーゼ2を検出することによって、腎疾患の程度を測定することができ、容易に実施することができる。

さらに、カゼインキナーゼ2の酵素活性の発現を指標とする場合では、蛋白リン酸化解析法、細胞内局在変化解析法などを利用して、または酵素活性解析法を利用して、カゼインキナーゼ2の蛋白質またはカゼインキナーゼ2蛋白質の部分ペプチドに酵素基質を接触させた場合における、カゼインキナーゼ2の蛋白質またはカゼインキナーゼ2蛋白質の部分ペプチドの酵素活性を検出する。上記において、酵素基質としてはカゼインキナーゼ2の蛋白質またはペプチドなどの酵素基質となり得るものであれば何れのものでもよく、通常、カゼインの蛋白質やカゼインキナーゼ2蛋白質の部分ペプチドが用いられる。また、上述のようにカゼインキナーゼ2は種々の方法により得ることができる。例えば、哺乳動物の臓器などから抽出精製して得ること、細胞を培養し分離精製して得ること、あるいは公知の遺伝子工学的手法によりカゼインキナーゼ2をコードする遺伝子を適切な宿主細胞に組み込み、この形質転換体の培養物から組換えカゼインキナーゼ2を

得ることができる。こうして得られたカゼインキナーゼ2は、そのアミノ酸配列の一部が欠失、もしくは置換したり、他のアミノ酸配列が一部挿入されていても、酵素活性を有する限り、カゼインキナーゼ2の酵素活性を阻害する物質の阻害活性の確認に使用できる。酵素活性解析法としては、例えば、検体（10 ng ~ 0.1 mg 蛋白量）に、酵素基質としてペプチドの Arg-Arg-Arg-Glu-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Glu あるいは Arg-Arg-Glu-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Glu（0.2 mM）を緩衝液（20 mM MOPS, pH 7.2, 25 mM β -グリセロールホスフェート, 5 mM EGTA, 1 mM オルソバナジウム酸ナトリウム、1 mM ジチオスレイトール、15 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $[\gamma-^{32}P]GTP$ あるいは $[\gamma-^{32}P]ATP$, 0.002 mCi）中で 37°C, 10 分間インキュベートすればよい。インキュベート後、40%トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させた後、反応液の一部をホスホセルロースペーパー（1 ~ 1.5 cm 角, Whatman P81 など）に分取する。酵素基質であるペプチドのリン酸化は、ホスホセルロースペーパーを 0.75% リン酸で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、さらにアセトンで 5 分間洗浄した後、ホスホセルロースペーパー上の ^{32}P の放射活性をシンチレーション（Econofluor-2, NEN など）で測定すればよい（Methods Enzymol. 第99巻、第3-6頁（1983年）に掲載の R. Roskoski の論文など）。この時、 ^{32}P の放射活性が高いことは、検体にカゼインキナーゼ2の蛋白質またはカゼインキナーゼ2蛋白質の部分ペプチドの酵素活性の発現が高いことを示している。なお、これらに類似した酵素活性解析法は市販の酵素活性測定キット（カゼインキナーゼ2キナーゼアッセイ、Upstate）を利用することもできるため、容易に実施することができる。

上記のプライマーや抗体などの産生技術および精製する技術は当該分野においてよく知られており、本発明のカゼインキナーゼ2の発現を特徴とする腎疾患の診断方法には、上記の通りカゼインキナーゼ2の遺伝子の発現、蛋白質の発現、酵素活性の発現を検出する方法がある。カゼインキナーゼ2の遺伝子発現を検出するためには、カゼインキナーゼ2遺伝子、それに対するプライマーおよび／ま

たはプローブが利用できる。カゼインキナーゼ2を検出するためには、カゼインキナーゼ2またはその部分ペプチドに対する抗体もしくは抗体の部分、またはカゼインキナーゼ2を特異的に認識する核酸（アプタマー）が利用できる。さらに、カゼインキナーゼ2酵素基質を腎疾患の診断に使用することも包含される。これらの技術を適宜選択することができ、カゼインキナーゼ2の発現の検出のための試薬キットを利用することによって、腎疾患の診断を簡便に実施することができる。故に本発明の腎疾患の診断方法は、上記のカゼインキナーゼ2の発現を指標とする、腎疾患の診断用試薬キット、試薬が提供される。

本発明の腎疾患の診断方法は、上記の各種のヒト腎疾患の診断に広く用いることができるばかりでなく、各種の腎疾患モデル動物に用いることができる。特に糸球体腎炎では多数の症例で免疫機序の関与を示唆する所見が認められており、これに基づきヒト慢性腎炎モデルとしての動物実験モデルの作製が種々研究されて来た。例えば抗糸球体基底膜抗体により誘発する腎疾患動物モデルに好ましく用いることができる。すなわち、本発明の方法により、腎疾患動物モデルが本当に腎疾患に罹患しているか否かのチェックを容易に行うことができる。抗糸球体基底膜抗体誘発による腎疾患動物モデルは、ラットやマウスにウサギより得た抗糸球体基底膜抗血清を投与することにより作製できる。抗糸球体基底膜抗血清は、ラットやマウスの腎皮質から糸球体基底膜を調製し、これをフロインドの完全アジュバントと共にウサギに与え、血清を得ることで調製できる（「新薬開発のための薬効スクリーニング法—最新の動向と実際—Vol. 1」、小澤光監修、清至書院、1984、P. 143）。最も一般的な原発性糸球体腎炎の病態モデルとして広範に利用される。形態上および臨床症候上の分類から原発性糸球体腎炎の中でも、半月体形成性糸球体腎炎および急性進行性糸球体腎炎に最も類似した病態モデルである。病態は、腎機能マーカーの尿中蛋白排泄量や、血中のクレアチニンの濃度、内因性クレアチニン・クリアランスを測定することにより把握できる。クレアチニンは腎臓から全く吸収されないため、腎疾患により糸球体濾過機能の低下すると、血中のクレアチニンの濃度が増加するので、血中のクレアチニンの濃度やクレアチニン・クリアランスは腎機能のよいマーカーとなる。腎炎誘発後2週

目では、血中クレアチニン濃度が正常値の約2倍に上昇し、一般的な糸球体濾過能の低下を伴う腎炎・腎不全の病態を呈する。このような抗糸球体基底膜抗体誘発による腎疾患動物モデルは、ヒト慢性腎炎モデルとして世界的に広く用いられており、鈴木良雄らの方法（日本腎臓学会誌23巻323～331頁 1981年）および（日本薬理学会誌77巻407～417頁 1981年）により用いることができる。また、本発明薬剤の有用性を確認することもできる。他の腎疾患動物モデルとしては、1）Thy-1モノクローナル抗体や抗胸腺抗体を用いる方法、2）遺伝性ネフローゼラットおよびマウスを用いる方法、3）マウス、ラットでの自然発症糖尿病モデルを用いる方法、4）マウス、ラットにストربتゾトシンあるいはアロキサンを投与して惹起した糖尿病モデル動物を用いる方法、5）5/6腎臓摘出モデルを用いる方法などが有用である。

以下、実施例に基づき、本発明をより具体的に説明する。

実施例1

腎臓組織すなわち腎臓を構成する細胞におけるカゼインキナーゼ2の発現と、腎疾患の状態との関係を解析した。すなわち、ラットを対象として、腎機能マーカーとして広く用いられている尿中蛋白排泄量を指標として腎疾患の状態を診断するとともに、腎臓組織中でのカゼインキナーゼ2 α サブユニット遺伝子の発現をRT-PCR法を用いて検出し、腎疾患の状態とカゼインキナーゼ2の発現の関係を解析した。

まず、ラット（Wistar-Kyoto系、雄性、体重190～210g、日本チャールス・リバー株式会社）にウサギの抗糸球体基底膜抗血清（0.3ml/kg）を静脈内より注射し、腎炎を誘発した。正常群のラットには、正常ウサギ血清（0.3ml/kg）を静脈内投与した。腎炎誘発後7～14日目に、すべてのラットを代謝ケージに入れ24時間分の尿を採取し、尿量を測定した後、3000rpm、15分間遠心して、その上清について尿蛋白をTPテストワコー（和光純薬）を使用して測定した。さらに、採尿終了後、腎臓を摘出し、腎臓から常法によりRNAを抽出し、RNAの1 μ gより市販の逆転写反应用キット（Invitrogen）を用いてcDNAを合成した。合成したcDNAの1 μ lずつを

鋳型にして、カゼインキナーゼ2 α サブユニットのプライマーを用いて市販のPCR用キット (Takara) によりPCR法を行い増幅した。プライマーは、ラットのカゼインキナーゼ2 α サブユニット遺伝子の完全長cDNAの塩基配列をもとにセンス・プライマー; 5'-agaaagcttcggctaataga
5 a-3'、アンチセンス・プライマー; 5'-actgaagaaatccctga
acat-3'を作製して用いた。また、PCRの温度サイクルは、94℃で30秒間、58℃で30秒間、72℃で40秒間からなる行程を1サイクルとし、30サイクル行い、最後に4℃にて終了するようにして行った。増幅したPCR産物の10 μ l ずつをアガロースゲル電気泳動した後、エチジウムブロマイド染
10 色を行い、カゼインキナーゼ2 α サブユニットの遺伝子の発現をそれぞれ測定した。この測定は、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現を、検出したカゼインキナーゼ2を写真撮影して画像ファイル化し、マッキントッシュ上のソフトウェアNIH Imageを用いて数値化することにより行った。なお、カゼインキナーゼ2 α サブユニットの遺伝子に関してPCRを行う際には、恒常的に発現している遺伝子 (ハウスキーピング遺伝子) のG3PDHを内部標準として検出し、
15 カゼインキナーゼ2 α サブユニット遺伝子の発現の検出結果を補正した。

その結果、図1に示すように、腎疾患状態にある腎臓組織すなわち腎臓を構成する細胞は、正常な腎臓に比べて、カゼインキナーゼ2 α サブユニット遺伝子の発現量が顕著に多い。また、腎臓組織すなわち腎臓を構成する細胞におけるカゼ
20 インキナーゼ2の遺伝子の発現量が多いほど腎疾患の状態は悪く、発現量が適正に近いほど腎疾患の状態は正常に近いことは容易に理解できる。

実施例2

カゼインキナーゼ2 α サブユニット遺伝子の発現を指標として、腎疾患を診断した。すなわち、ラットを対象として、腎臓組織すなわち腎臓を構成する細胞で
25 のカゼインキナーゼ2 α サブユニット遺伝子の発現をRT-PCR法を用いて検出し、これを指標として腎疾患を診断した。

まず、ラット (Wistar-Kyoto 系、雄性、体重190~210 g、日本チャールス・リバー株式会社) にウサギの抗糸球体基底膜抗血清 (0.3 ml/kg)

を静脈内より注射し、腎炎を誘発した。正常群のラットには、正常ウサギ血清（ 0.3 ml/kg ）を静脈内投与した。腎炎誘発後に、ラットを代謝ケージに入れ24時間分の尿を採取し、採尿終了後、腎臓を摘出し、診断対象とする腎臓、および、その対照とする非腎疾患状態の腎臓から常法によりRNAをそれぞれ抽出し、各RNAの $1\mu\text{g}$ ずつより市販の逆転写反应用キット（Invitrogen）を用いてcDNAをそれぞれ合成した。合成した各cDNAの $1\mu\text{l}$ ずつを鋳型にして、カゼインキナーゼ2 α サブユニットのプライマーを用いて、市販のPCR用キット（Takara）によりPCR法を行い、これらをそれぞれ増幅した。プライマーは、ラットのカゼインキナーゼ2 α サブユニット遺伝子の完全長cDNAの塩基配列をもとにセンス・プライマー；5'-agaaagcttcggctaataga-3'、アンチセンス・プライマー；5'-actgaagaaatccctgacat-3'を作製して用いた。また、PCRの温度サイクルは、 94°C で30秒間、 58°C で30秒間、 72°C で40秒間からなる行程を1サイクルとし、30サイクル行い、最後に 4°C にて終了するようにして行った。増幅した各PCR産物の $10\mu\text{l}$ ずつをアガロースゲル電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色を行い、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現をそれぞれ測定した。この測定は、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現を、検出したカゼインキナーゼ2を写真撮影して画像ファイル化し、マッキントッシュ上のソフトウェアNIH Imageを用いて数値化することにより行った。なお、カゼインキナーゼ2の遺伝子に関してPCRを行う際には、恒常的に発現している遺伝子（ハウスキーピング遺伝子）のG3PDHを内部標準として検出し、カゼインキナーゼ2 α サブユニット遺伝子の発現の検出結果を補正した。

診断対象とする腎臓でのカゼインキナーゼ2 α サブユニット遺伝子の発現と、その対照とする非腎疾患状態の腎臓でのカゼインキナーゼ2 α サブユニット遺伝子の発現を比較したところ、診断対象とする腎臓でのカゼインキナーゼ2サブユニット遺伝子の発現は、その陰性対照とする非腎疾患状態の腎臓でのカゼインキナーゼ2 α サブユニット遺伝子の発現よりも高かった（表1）。したがって、診断対象とする腎臓は腎疾患状態にあり、特にカゼインキナーゼ2が関与する腎疾患

状態と診断された。そこで、これらの診断結果を検証するために、腎疾患状態にあると診断されたラット個体の腎機能マーカーとして広く用いられている尿中蛋白排泄量を測定した。また、その対照とする非腎疾患状態の個体についても同様に測定した。その結果、腎疾患状態にあると診断された個体の尿蛋白は、非腎疾患状態の個体のものよりも明らかに高かった(表2)。よって、本診断法によって腎疾患状態にあると診断された個体は、確かに腎疾患状態にあることが確かめられ、本発明の診断方法が、腎疾患の病態を的確に判定できることが実証された。

表1

カゼインキナーゼ2 α サブユニット遺伝子の発現を指標として腎疾患を診断した時の、カゼインキナーゼ2 α サブユニット遺伝子の発現の検出結果を数値として示す。

腎臓	発現比 (カゼインキナーゼ2/G3PDH)
診断対象の腎臓	3.4
非腎疾患状態の腎臓	1.1

表2

カゼインキナーゼ2 α サブユニット遺伝子の発現を指標として腎疾患状態にあると診断された個体の、尿蛋白の測定結果を示す。

個体	尿蛋白 (mg/日)
腎疾患状態にあると診断された個体	142.9
非腎疾患状態の個体	28.7

実施例3

カゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の発現を指標として、腎疾患を診断した。すなわち、ラット (Wistar-Kyoto 系、雄性、体重190~210g、日本チャールス・リバー株式会社) を対象として、腎臓でのカゼインキナーゼ2の β サブユニット遺伝子の発現をRT-PCR法を用いて検出し、これを指標として腎疾患を診断した。

まず、ラットにウサギの抗糸球体基底膜抗血清 (0.3ml/kg) を静脈内

より注射し、腎炎を誘発した。正常群のラットには、正常ウサギ血清（0.3 ml/kg）を静脈内投与した。腎炎誘発後にラットを代謝ケージに入れ24時間分の尿を採取し、採尿終了後、腎臓を摘出し、診断対象とする腎臓、および、その対照とする非腎疾患状態の腎臓から常法によりRNAをそれぞれ抽出し、各RNAの1 μ gずつより市販の逆転写反应用キット（Invitrogen）を用いてcDNAをそれぞれ合成した。合成した各cDNAの1 μ lずつを鋳型にして、カゼインキナーゼ2の β サブユニットのプライマーを用いて、市販のPCR用キット（Takara）によりPCR法を行い、これらをそれぞれ増幅した。プライマーは、ラットのカゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の完全長cDNAの塩基配列をもとにセンス・プライマー；5'-ccgcggacataaagatgagt-3'、アンチセンス・プライマー；5'-aaaccagtgccgaagtatgc-3'を作製して用いた。また、PCRの温度サイクルは、94 $^{\circ}$ Cで30秒間、58 $^{\circ}$ Cで30秒間、72 $^{\circ}$ Cで40秒間からなる行程を1サイクルとし、30サイクル行い、最後に4 $^{\circ}$ Cにて終了するようにして行った。

増幅した各PCR産物の10 μ lずつをアガロースゲル電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色を行い、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現をそれぞれ測定した。この測定は、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現を、検出したカゼインキナーゼ2を写真撮影して画像ファイル化し、マッキントッシュ上のソフトウェアNIH Imageを用いて数値化することにより行った。なお、カゼインキナーゼ2の遺伝子に関してPCRを行う際には、恒常的に発現している遺伝子（ハウスキーピング遺伝子）のG3PDHを内部標準として検出し、カゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の発現の検出結果を補正した。

診断対象とする腎臓でのカゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の発現と、その対照とする非腎疾患状態の腎臓でのカゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の発現を比較したところ、診断対象とする腎臓でのカゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の発現は、その陰性対照とする非腎疾患状態の腎臓でのカゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の発現よりも高かった（表3）。したがって、診断対象とする腎臓は腎疾患状態にあり、特にカゼインキナーゼ2が関与する腎疾

患状態と診断された。そこで、これらの診断結果を検証するために、腎疾患状態にあると診断されたラット個体の腎機能マーカーとして広く用いられている尿中蛋白排泄量を測定した。また、その対照とする非腎疾患状態の個体についても同様に測定した。その結果、腎疾患状態にあると診断された個体の尿蛋白は、非腎疾患状態の個体のものよりも明らかに高かった(表4)。よって、本診断法によって腎疾患状態にあると診断された個体は、確かに腎疾患状態にあることが確かめられ、本発明の診断方法が、腎疾患の病態を的確に判定できることが実証された。

表3

カゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の発現を指標として腎疾患を診断した時の、カゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の発現の検出結果を数値として示す。

腎臓	発現比 (カゼインキナーゼ2/G3PDH)
診断対象の腎臓	4.5
非腎疾患状態の腎臓	1.4

表4

カゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の発現を指標として腎疾患状態にあると診断された個体の、尿蛋白の測定結果を示す。

個体	尿蛋白 (mg/日)
腎疾患状態にあると診断された個体	146.2
非腎疾患状態の個体	37.4

実施例4

カゼインキナーゼ2の発現を指標として、腎疾患を診断した。すなわち、糖尿病性腎症を自然発症する糖尿病ラット(Zucker系)を対象として、腎臓でのカゼインキナーゼ2 β サブユニットの遺伝子の発現をRT-PCR法を用いて検出し、これを指標として糖尿病性腎症を診断した。糖尿病性腎症を自然発症する糖尿病ラット(Zucker fa/fa系、6ヶ月齢、日本チャールス・リバー株式会社)および、その対照とする糖尿病性腎症を自然発症しないラット(

Zucker Lean系、6ヶ月齢、日本チャールス・リバー株式会社) から血液を採取し、採血終了後に腎臓を摘出した。診断対象とする腎臓、およびその対照とする非腎疾患状態の腎臓から常法によりRNAをそれぞれ抽出し、各RNAの1 μ gずつより市販の逆転写反应用キット (Invitrogen) を用いてcDNAをそれぞれ合成した。合成した各cDNAの1 μ lずつを鋳型にして、カゼインキナーゼ2 α サブユニットのプライマーを用いて、市販のPCR用キット (Takara) によりPCR法を行いこれらをそれぞれ増幅した。プライマーは、ラットのカゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の完全長cDNAの塩基配列をもとにセンス・プライマー; 5'-ccgcggacataaagatgagt-3'、アンチセンス・プライマー; 5'-aaaccagtgccgaagtatgc-3'を作製して用いた。また、PCRの温度サイクルは、94 $^{\circ}$ Cで30秒間、58 $^{\circ}$ Cで30秒間、72 $^{\circ}$ Cで40秒間からなる行程を1サイクルとし、30サイクル行い、最後に4 $^{\circ}$ Cにて終了するようにして行った。増幅した各PCR産物の10 μ lずつをアガロースゲル電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色を行い、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現をそれぞれ測定した。この測定は、カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現を、検出したカゼインキナーゼ2を写真撮影して画像ファイル化し、マッキントッシュ上のソフトウェアNIH Imageを用いて数値化することにより行った。なお、カゼインキナーゼ2の遺伝子に関してPCRを行う際には、恒常的に発現している遺伝子 (ハウスキーピング遺伝子) のG3PDHを内部標準として検出し、カゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の発現の検出結果を補正した。

診断対象とする腎臓でのカゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の発現と、その対照とする非腎疾患状態の腎臓でのカゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の発現を比較したところ、診断対象とする腎臓でのカゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の発現は、その陰性対照とする非腎疾患状態の腎臓でのカゼインキナーゼ2 β サブユニット遺伝子の発現よりも高かった (表5)。したがって、診断対象とする腎臓は腎疾患状態にあり、特にカゼインキナーゼ2が関与する腎疾患状態と診断された。そこで、これらの診断結果を検証するために、腎疾患状

態にあると診断されたラット個体の腎機能マーカーとして広く用いられている血中クレアチニン濃度および血中尿素窒素濃度を測定した。また、その対照とする非腎疾患状態の個体についても同様に測定した。その結果、腎疾患状態にあると診断された個体の血中クレアチニン濃度は、非腎疾患状態の個体のものよりも明らかに高かった（表6）。また、腎疾患状態にあると診断された個体の血中尿素窒素濃度は、非腎疾患状態の個体のものよりも明らかに高かった（表6）。よって、本診断法によって腎疾患状態にあると診断された個体は、確かに腎疾患状態にあることが確かめられ、本発明の診断方法が、腎疾患の病態を的確に判定できることが実証された。

表5

カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現を指標として腎疾患を診断した時の、カゼインキナーゼ2遺伝子の発現の検出結果を数値として示す。

腎臓	発現比（カゼインキナーゼ2/G3PDH）
診断対象の腎臓	3.6
非腎疾患状態の腎臓	1.0

表6

カゼインキナーゼ2の遺伝子の発現を指標として腎疾患状態にあると診断された個体の、血中クレアチニン濃度および血中尿素窒素濃度の測定結果を示す。

個体	血中クレアチニン濃度 (mg/100ml)	血中尿素窒素濃度 (mg/100ml)
腎疾患状態にあると診断された個体	0.89	69.0
非腎疾患状態の個体	0.38	18.3

実施例5

カゼインキナーゼ2の含有量を指標として、腎疾患を診断した。すなわち、ラットを対象として、腎臓でのカゼインキナーゼ2の α サブユニットおよび β サブユニットの蛋白量をウエスタンブロット法を用いて検出し、これを指標として腎疾患を診断した。

まず、ラット（Wistar-Kyoto系、雄性、体重190～210g、日本チャールス・リバー株式会社）にウサギの抗糸球体基底膜抗血清（0.3ml/kg

）を静脈内より注射し、腎炎を誘発した。正常群のラットには、正常ウサギ血清（ 0.3 ml/kg ）を静脈内投与した。腎炎誘発後にラットを代謝ケージに入れ24時間分の尿を採取し、採尿終了後に腎臓を摘出し、診断対象とする腎臓、および、その対照とする非腎疾患状態の腎臓から常法により蛋白質をそれぞれ抽出し、各蛋白質（ 1 mg/ml 、 $20\text{ }\mu\text{ l}$ ）を12.5%ポリアクリルアミドゲル（PAGE, ATTO）を用いて電気泳動（PAGERUN, ATTO, 40 mA , 84 min ）した。泳動した各蛋白質をPVDFメンブレン（ミリポア）にブロット（ 100 V 、 90 min ）した。メンブレンをブロッキング（ブロッキングエース、大日本製薬、 4°C 、1時間）し、Tween 20含有PBSで3回洗浄（ 10 min ）した後、一次抗体としてカゼインキナーゼ2 α サブユニットに対する抗体（ヤギ由来、Santa cruz, 100倍希釈）あるいはカゼインキナーゼ2 β サブユニットに対する抗体（ヤギ由来、Santa cruz, 100倍希釈）を用いてインキュベート（室温、1時間）した。インキュベート後、Tween 20含有PBSで3回洗浄（ 10 min ）した後、二次抗体としてヤギIgGに対するHRP標識抗体（Santa cruz, 1000倍希釈）を用いてインキュベート（室温、1時間）した。インキュベート後、ECL試薬（アマシャム）を用いてカゼインキナーゼ2 α サブユニットあるいはカゼインキナーゼ2 β サブユニットの蛋白量をそれぞれ測定した。この測定は、カゼインキナーゼ2の蛋白量を、検出したカゼインキナーゼ2を写真撮影して画像ファイル化し、マッキントッシュ上のソフトウェアNIH Imageを用いて数値化することにより行った。

診断対象とする腎臓でのカゼインキナーゼ2 α サブユニットの蛋白量と、その対照とする非腎疾患状態の腎臓でのカゼインキナーゼ2 α サブユニットの蛋白量を比較したところ、診断対象とする腎臓でのカゼインキナーゼ2 α サブユニットの蛋白量は、その陰性対照とする非腎疾患状態の腎臓でのカゼインキナーゼ2 α サブユニットの蛋白量よりも高かった（表7）。また、診断対象とする腎臓でのカゼインキナーゼ2 β サブユニットの蛋白量と、その対照とする非腎疾患状態の腎臓でのカゼインキナーゼ2 β サブユニットの蛋白量を比較した

ところ、診断対象とする腎臓でのカゼインキナーゼ2 β サブユニットの蛋白量は、その陰性対照とする非腎疾患状態の腎臓でのカゼインキナーゼ2 β サブユニットの蛋白量よりも高かった（表8）。したがって、診断対象とする腎臓は腎疾患状態にあり、特にカゼインキナーゼ2が関与する腎疾患状態と診断された。そこで、これらの診断結果を検証するために、腎疾患状態にあると診断されたラット個体の腎機能マーカーとして広く用いられている尿中蛋白排泄量を測定した。また、その対照とする非腎疾患状態の個体についても同様に測定した。その結果、腎疾患状態にあると診断された個体の尿蛋白は、非腎疾患状態の個体のものよりも明らかに高かった（表9）。よって、本診断法によって腎疾患状態にあると診断された個体は、確かに腎疾患状態にあることが確かめられ、本発明の診断方法が、腎疾患の病態を的確に判定できることが実証された。また、腎臓を構成する細胞におけるカゼインキナーゼ2の発現量すなわち含有量が多いほど腎疾患の状態は悪く、発現量すなわち含有量が適正に近いほど腎疾患の状態は正常に近いことも容易に理解できる。

表7

カゼインキナーゼ2 α サブユニットの含有量を指標として腎疾患を診断した時の、カゼインキナーゼ α サブユニットの蛋白量の検出結果を数値として示す。

腎臓	カゼインキナーゼ2 α サブユニットの蛋白量比
診断対象の腎臓	2. 2
非腎疾患状態の腎臓	1. 0

表8

カゼインキナーゼ β サブユニットの含有量を指標として腎疾患を診断した時の、カゼインキナーゼの β サブユニットの蛋白量の検出結果を数値として示す。

腎臓	カゼインキナーゼ2 β サブユニットの蛋白量比
診断対象の腎臓	2. 4
非腎疾患状態の腎臓	1. 0

表 9

カゼインキナーゼ 2 の α サブユニットおよび β サブユニットの含有量を指標として腎疾患状態にあると診断された個体の、尿蛋白の測定結果を示す。

5	個体	尿蛋白 (mg/日)
	腎疾患状態にあると診断された個体	151.7
	非腎疾患状態の個体	38.3

実施例 6

10 カゼインキナーゼ 2 の蛋白量と酵素活性の関係を解析した。すなわち、種々の蛋白量 (0、10あるいは20 ng 蛋白量) のカゼインキナーゼ 2 (Upstate) を、酵素基質の Arg-Arg-Arg-Glu-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Glu (10 nmol, 0.2 mM, Upstate) を含む緩衝液 (20 mM MOPS, pH 7.2, 25 mM β -グリセロールホ
 15 スフェート, 5 mM EGTA, 1 mM オルソバナジウム酸ナトリウム, 1 mM ジチオスレイトール, 15 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $[\gamma-^{32}P]ATP$, 0.002 mCi、アマシャム) 0.05 ml 中で 37°C, 10 分間インキュベートした。インキュベート後、40%トリクロロ酢酸 0.025 ml を加えて反応を停止させた後、反応液の一部 0.025 ml をホスホセルロースペーパー (20
 25 1 cm 角) に分取した。ホスホセルロースペーパーを 0.75% リン酸 25 ml で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、さらにアセトン 25 ml で 5 分間洗浄した後、ホスホセルロースペーパー上の ^{32}P の放射活性をシンチレーションで測定した。

その結果、表 10 に示すように、カゼインキナーゼ 2 の蛋白質量が多いほど、カゼインキナーゼ 2 の酵素活性すなわち機能は高く、カゼインキナーゼ 2 の蛋白質の発現量すなわち含有量は、カゼインキナーゼ 2 の酵素活性すなわち機能と極めて密接な関係にあることが容易に理解できる。これらは、カゼインキナーゼ 2 の遺伝子の発現、蛋白質の発現量すなわち含有量、および酵素活性すなわち機能が
 高いほど腎疾患の状態は悪く、これらが抑制され適正に近いほど腎疾患の状態は正常に近いこと示している。

表 10

カゼインキナーゼ2の蛋白量と酵素活性の関係を示す。

蛋白量 (ng)	酵素活性 (cpm)
0	4511
10	46751
20	92203

実施例7

本実施例は、カゼインキナーゼ2 α サブユニットのアンチセンス・オリゴヌクレオチド投与の腎炎のラットモデルに対する効果を検討し、本発明の有用性を確認するために行なったものである。ラット (Wistar-Kyoto 系、雄性、体重190～210g) にウサギの抗糸球体基底膜抗血清 (0.3ml/kg) を静脈内より注射し、腎炎を誘発した。カゼインキナーゼ2 α サブユニットの発現を選択的に阻害するアンチセンス・オリゴヌクレオチドの5'-GTAATCATCTTGATTACCCCA-3'、およびカゼインキナーゼ2 α サブユニットの発現を阻害しない陰性対照のセンス・オリゴヌクレオチドの5'-TG GGGTATCAATCAAGATGATTAC-3'を、カゼインキナーゼ2の阻害のために適当とされる12 μ g/日の投与量で、ポリエチレンチューブ (PE-10) を接続したアルザポンプ (0.25 μ l/時間、1002、Alzet) を用いて、腎炎誘発前日から7日目まで持続的に腎炎ラットの腎臓組織内に投与した。なお、オリゴヌクレオチドの核酸分子はホスホロチオエート部分を含むS-オリゴヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチドの取り込みを容易にするためにカチオン性液体 (Polyplus transfection) を用いた。すなわち、実験群の構成は、正常群 (カゼインキナーゼ2 α サブユニットのアンチセンス・オリゴヌクレオチドおよびアンチセンス・オリゴヌクレオチドを投与しない正常ラット、n=8)、腎炎対照群 (カゼインキナーゼ2 α サブユニットのアンチセンス・オリゴヌクレオチドおよびアンチセンス・オリゴヌクレオチドを投与しない腎炎ラット、n=8)、腎炎+カゼインキナーゼ2 α サブユニットのアンチセンス・オリゴヌクレオチド投与群 (本発明群、カゼインキナーゼ2 α サブユニットのアンチセンス・オリゴヌクレオチドを投与する腎炎ラット、n=4)、

腎炎+カゼインキナーゼ2 α サブユニットのセンス・オリゴヌクレオチド投与群
(陰性対照群、カゼインキナーゼ2 α サブユニットのセンス・オリゴヌクレオチ
ドを投与する腎炎ラット)の4群である。誘発後7日目に、すべてのラットを代
謝ケージに入れ24時間分の尿を採取し、尿量測定後、3000rpm、15分間
5 遠心して、その上清について尿蛋白を定量した。また、採尿終了後に腎臓を摘出
し、腎臓組織から常法により蛋白質をそれぞれ抽出し、各蛋白質(1mg/ml、
20 μ l)を12.5%ポリアクリルアミドゲル(PAGE, ATTO)を用
いて電気泳動(PAGERUN, ATTO, 40mA, 84min)した。泳動
した各蛋白質をPVDFメンブレン(ミリポア)にブロット(100V、90m
10 in)した。メンブレンをブロッキング(ブロッキングエース、大日本製薬、4
 $^{\circ}$ C、1時間)し、Tween 20含有PBSで3回洗浄(10min)した後、
一次抗体としてカゼインキナーゼ2 α サブユニットに対する抗体(ヤギ由来、s
anta cruz, 100倍希釈)を用いてインキュベート(室温、1時間)
した。インキュベート後、Tween 20含有PBSで3回洗浄(10min)
15 した後、二次抗体としてヤギIgGに対するHRP標識抗体(santa cr
uz, 1000倍希釈)を用いてインキュベート(室温、1時間)した。インキ
ュベート後、ECL試薬(アマシャム)を用いてカゼインキナーゼ2 α サブユニ
ットの蛋白量をそれぞれ測定した。この測定は、カゼインキナーゼ2の蛋白量
を、検出したカゼインキナーゼ2を写真撮影して画像ファイル化し、マッキント
20 ュッシュ上のソフトウェアNIH Imageを用いて数値化することにより行っ
た。

結果を表11および図2に示した。本発明であるカゼインキナーゼ2 α サブユ
ニットのアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、腎臓組織すなわち腎臓を構成す
る細胞におけるカゼインキナーゼ2 α サブユニット蛋白質の発現量すなわち含有
25 量を顕著に低下させ(表11)、腎疾患状態の重要な指標である蛋白尿を有意に
低下させた(図2)。他方、陰性対照となるカゼインキナーゼ2 α サブユニット
のセンス・オリゴヌクレオチドは、腎臓組織中すなわち腎臓を構成する細胞にお
けるカゼインキナーゼ2 α サブユニット蛋白質の発現量すなわち含有量を低下さ

せることはなく（表 1 1）、腎炎ラットの蛋白尿も有意に低下させなかった（図 2）。つまり、腎臓組織すなわち腎臓を構成する細胞におけるカゼインキナーゼ 2 を低下あるいは阻害する手段および物質は、腎疾患の状態を正常に近い状態にさせる作用あるいは効果を有し、腎疾患を治療および予防する作用あるいは効果を有することが一般的に認識できる理論的な説明がなされている。カゼインキナーゼ 2 のアンチセンス・オリゴヌクレオチド投与群と腎炎対照群間、およびカゼインキナーゼ 2 のアンチセンス・オリゴヌクレオチド投与群と陰性対照群間に体重の差はなく、また各臓器の障害は何ら認められなかったことから、本アンチセンス・オリゴヌクレオチドが腎疾患の治療剤として安全に用いられることが明らかになった。

表 1 1 腎炎のラットモデルにおける腎臓組織中のカゼインキナーゼ 2 α サブユニットの蛋白量に対するカゼインキナーゼ 2 α サブユニットのアンチセンス・オリゴヌクレオチド投与およびセンス・オリゴヌクレオチド投与の効果を数値として示す。

腎臓	カゼインキナーゼ 2 α サブユニットの蛋白量比
アンチセンス・オリゴヌクレオチド投与の腎臓	0. 4 5
センス・オリゴヌクレオチド投与の腎臓	1. 0 7
非投与の腎臓	1

実施例 8

カゼインキナーゼ 2 の酵素活性に対する、化合物であるアピゲニンの阻害作用を検討した。すなわち、カゼインキナーゼ 2（10 ng 蛋白量、Upstate）を、酵素基質である Arg-Arg-Arg-Glu-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Glu（10 nmol, 0. 2 mM, Upstate）とともに、0. 1 から 100 μ M までの濃度範囲のアピゲニンを含む緩衝液（20 mM MOPS, pH 7. 2, 25 mM β -グリセロールホスフェート, 5 mM EGTA, 1 mM オルソバナジウム酸ナトリウム, 1 mM ジチオスレイトール, 15 mM MgCl₂, 0. 1 mM [γ -³²P]ATP, 0. 002 mCi、アマシャム）0. 05 ml 中で 37°C, 10 分間インキュベートした。イン

キュベート後、40%トリクロロ酢酸0.025mlを加えて反応を停止させた後、反応液の一部0.025mlをホスホセルロースペーパー（1cm角）に分取した。ホスホセルロースペーパーを0.75%リン酸25mlで5分間ずつ3回洗浄し、さらにアセトン25mlで5分間洗浄した後、ホスホセルロースペーパー上の ^{32}P の放射活性をシンチレーションで測定した。アピゲニンを含まない緩衝液中で測定した ^{32}P の放射活性を100%とした場合の、各濃度の阻害物質を含む緩衝液中で測定した ^{32}P の放射活性の割合をそれぞれ%で表し、これによりアピゲニンの、カゼインキナーゼ2の機能的活性又は効果に対する効果を決定した。

その結果、アピゲニンは10 μM の濃度でカゼインキナーゼ2の酵素活性を25%阻害し、100 μM の濃度で75%阻害した（図3）。したがって、アピゲニンは、カゼインキナーゼ2の酵素活性を阻害する物質として好ましいことがわかる。

実施例9

本実施例は、カゼインキナーゼ2の酵素活性を阻害する物質として好ましいアピゲニンを用いて、腎炎のラットモデルにおけるカゼインキナーゼ2阻害剤投与の効果を検討し、本発明の有用性を一層確認するために行なったものである。

ラット（Wistar-Kyoto系、雄性、体重190～210g、日本チャールス・リバー株式会社）にウサギの抗糸球体基底膜抗血清（0.3ml/kg）を静脈内より注射し、腎炎を誘発した。正常群のラットには、正常ウサギ血清（0.3ml/kg）を静脈内投与した。カゼインキナーゼ2の酵素活性を阻害する物質として好ましいカゼインキナーゼ2阻害剤のアピゲニンを、カゼインキナーゼ阻害のために適当とされる体重1kgあたり20mgの投与量で、腎炎誘発後1日目から14日目まで連日1日1回、腎炎ラットに腹腔内投与した。投与したアピゲニン溶液の組成は、アピゲニンを、ジメチルスルホキシドと0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース・ナトリウムの1：4の割合の混合液であった。カゼインキナーゼ2阻害剤を投与しないラットには、溶媒のみを腹腔内投与した。すなわち、実験群の構成は、正常群（カゼインキナーゼ2阻害剤を投与しない正

常ラット、 $n=5$)、腎炎対照群(カゼインキナーゼ2阻害剤を投与しない腎炎ラット、 $n=5$)および、腎炎+カゼインキナーゼ2阻害剤投与群(本発明群、カゼインキナーゼ2阻害剤を投与する腎炎ラット、 $n=5$)の3群である。誘発後7日目にすべてのラットを代謝ケージに入れ24時間分の尿を採取し、尿量測定後、3000rpm、15分間遠心して、その上清について尿蛋白をTPテストワコー(和光純薬)を使用して定量した。

結果を図4に示した。本発明のカゼインキナーゼ2阻害剤は腎疾患の重要な指標である蛋白尿を有意に低下させ、腎疾患の状態をほぼ正常化させた。つまり、腎疾患状態にある腎臓に対して、化合物を用いてカゼインキナーゼ2の酵素活性を阻害すれば、腎疾患の状態を正常に近い状態にさせる作用あるいは効果を有し、腎疾患を治療および予防する作用あるいは効果を有することが示されている。言い換えれば、腎疾患状態にある腎臓に対して、カゼインキナーゼ2を阻害する機能を有する物質は、腎疾患の状態を正常に近い状態にさせる作用あるいは効果を有し、腎疾患を治療および予防する作用あるいは効果を有することが示されている。すなわち、一般にカゼインキナーゼ2を阻害する作用を有する手段および物質は腎疾患を治療および予防する作用を有することが明らかである。カゼインキナーゼ2阻害剤を投与することにより、腎疾患が治療できることを示している。カゼインキナーゼ2の阻害剤投与群と腎炎対照群間に体重の差はなく、また各臓器の障害は何ら認められなかったことから、本化合物が腎疾患の治療剤として安全に用いられることが明らかになった。

実施例10

本実施例は、本発明の有用性をさらに一層確認するために行なったものである。種々の薬理作用が知られているが、カゼインキナーゼ2の酵素活性を阻害する作用も有するとして知られている3-メチルー1,6,8-トリヒドロキシアントラキノン(Battistutta R et al. J Biol Chem 2000, 275(38):29618-22)を用いて、腎炎のラットモデルにおけるカゼインキナーゼ2阻害剤投与の効果を検討した。

ラット(Wistar-Kyoto系、雄性、体重190~210g、日本チャールス・リバー株式会社)にウサギの抗系球体基底膜抗血清(0.3ml/kg)を静脈

内より注射し、腎炎を誘発した。正常群のラットには、正常ウサギ血清（0.3 ml/kg）を静脈内投与した。3-メチルー1,6,8-トリヒドロキシアントラキノンを（Battistutta R et al. J Biol Chem 2000, 275(38):29618-22）を、カゼインキナーゼ阻害のために適当とされる体重1 kgあたり20 mgの投与量で、
5 腎炎誘発後1日目から14日目まで連日1日1回、腎炎ラットに腹腔内投与した。投与した3-メチルー1,6,8-トリヒドロキシアントラキノンの組成は、3-メチルー1,6,8-トリヒドロキシアントラキノンを、ジメチルスルホキシドと0.5%（w/v）カルボキシメチルセルロース・ナトリウムの1:4の割合の混合液であった。カゼインキナーゼ2阻害剤を投与しないラットには、溶媒
10 のみを腹腔内投与した。すなわち、実験群の構成は、正常群（カゼインキナーゼ2阻害剤を投与しない正常ラット、n=5）、腎炎対照群（カゼインキナーゼ2阻害剤を投与しない腎炎ラット、n=5）および、腎炎+カゼインキナーゼ2阻害剤投与群（本発明群、カゼインキナーゼ2阻害剤を投与する腎炎ラット、n=5）の3群である。誘発後7日目にすべてのラットを代謝ケージに入れ24時間
15 分の尿を採取し、尿量測定後、3000rpm、15分間遠心して、その上清について尿蛋白をTPテストワコー（和光純薬）を使用して定量した。誘発後14日目に、ラットを代謝ケージに入れ24時間分の尿を採取し、尿量測定後、3000rpm、15分間遠心して、その上清について尿中のクレアチニン濃度をクレアチニンテストワコー（和光純薬）を使用して測定した。さらに、採尿終了後、尾
20 静脈より採血し、採血した血液は3000rpm、15分間遠心後、血清について血中のクレアチニン濃度をクレアチニンテストワコー（和光純薬）を使用して定量した。尿中のクレアチニン濃度と血中のクレアチニン濃度からクレアチニン・クリアランスを算出した。また、腎を摘出し、10%緩衝ホルマリンにて固定後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して鏡検した。

25 結果を図5、6および7に示した。種々の薬理作用が知られているが、カゼインキナーゼ2の酵素活性を阻害する作用も有するとして知られている3-メチルー1,6,8-トリヒドロキシアントラキノンは腎疾患の重要な指標である蛋白尿を有意に低下させるとともに、血中のクレアチニン濃度、クレアチニン・クリア

ランスをほぼ正常化させた。腎組織病理所見においても、3-メチルー1,6,8-トリヒドロキシアントラキノン投与群では腎炎対照群に比して、糸球体および尿細管間質の改善が認められた。つまり、カゼインキナーゼ2阻害剤を投与することにより、腎疾患が治療できることを示している。

5

産業上の利用可能性

本発明の腎疾患治療又は予防剤は、腎疾患の治療又は予防に用いることができる。また、本発明の診断（検出）方法によれば、腎疾患を的確かつ簡便に診断（検出）することができる。

請求の範囲

1. カゼインキナーゼ2を阻害する物質を有効成分として含有する腎疾患の治療又は予防剤。

2. 前記カゼインキナーゼ2が、腎臓の構成細胞に由来する請求項1記載の腎疾患の治療又は予防剤。

3. 前記物質が、カゼインキナーゼ2の α サブユニット及び/又は α' サブユニットを阻害する物質である請求項1又は2記載の腎疾患の治療又は予防剤。

4. 前記カゼインキナーゼ2を阻害する物質が、(1)カゼインキナーゼ2の発現を阻害する物質 又は(2)カゼインキナーゼ2の酵素活性を阻害する物質である請求項1ないし3のいずれか1項に記載の腎疾患の治療又は予防剤。

5. 前記カゼインキナーゼ2を阻害する物質が、カゼインキナーゼ2の発現を阻害する核酸分子である請求項4記載の腎疾患の治療又は予防剤。

6. 前記カゼインキナーゼ2の発現を阻害する核酸分子が、カゼインキナーゼ2をコードするmRNAを標的とし、かつカゼインキナーゼ2の発現を阻害し得るカゼインキナーゼ2に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドである請求項5に記載の腎疾患の治療又は予防剤。

7. 前記カゼインキナーゼ2に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドが、カゼインキナーゼ2をコードするmRNAのコーディング領域、3' - 非翻訳領域、5' - 非翻訳領域、5' キャップ及びイントロン/エキソン結合部位に対して相補的な配列からなる群より選ばれる配列を有する12~50塩基である請求項6記載の腎疾患の治療又は予防剤。

8. 前記カゼインキナーゼ2に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドの核酸分子が、S-オリゴヌクレオチドである請求項7記載の腎疾患の治療又は予防剤。

9. 前記のカゼインキナーゼ2に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドの核酸分子が、配列番号1~10に示すいずれかの配列を有する請求項7又は8記載の腎疾患の治療又は予防剤。

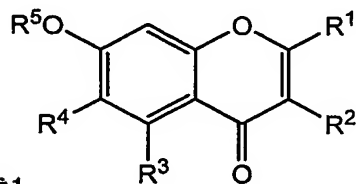
10. 前記のカゼインキナーゼ2に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチド

c が、配列番号 1 に示す配列を有する請求項 9 記載の腎疾患の治療又は予防剤。

11. カゼインキナーゼ 2 を阻害する物質が、カゼインキナーゼ 2 の酵素活性を阻害する化合物である請求項 4 記載の腎疾患の治療又は予防剤。

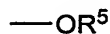
12. 前記のカゼインキナーゼ 2 の酵素活性を阻害する化合物が、1 pM から 100 μM までの濃度範囲で、カゼインキナーゼ 2 の酵素活性を 30% 以上阻害する化合物である請求項 11 記載の腎疾患の治療又は予防剤。

13. 前記のカゼインキナーゼ 2 の酵素活性を阻害する化合物が、



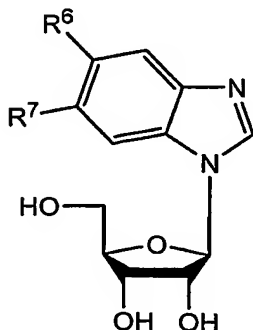
式1

(但し式 1 中、R¹、R²はそれぞれ独立に水素原子、水酸基、または式 2 に表される置換基から選ばれる 1 種乃至は 2 種以上を有していても良いフェニル基を表し、且つ、R¹、R²の少なくとも一方は該置換基を有していても良いフェニル基であり、R³、R⁴ はそれぞれ独立に水素原子又は式 2 に表される置換基を表し、R⁵は水素原子、糖残基、C1~4 アルキル基又はアシル基を表す。)



式2

(但し、式中 R⁵は式 2 の R⁵と同じ意味を表す)、



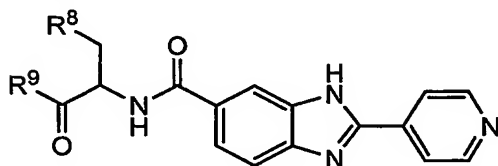
式3

(但し式 3 中、 R^6 、 R^7 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子又は C1~4 アルキル基である。)

4, 5, 6, 7-テトラブロモベンズイミダゾールである TBB、5, 6-ジブロモ-1-(β -D-リボフラノシル)ベンズイミダゾールである DRB、

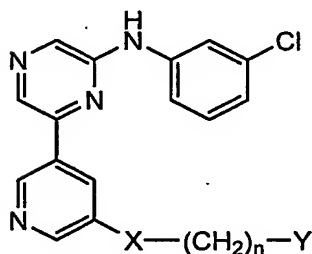


又は



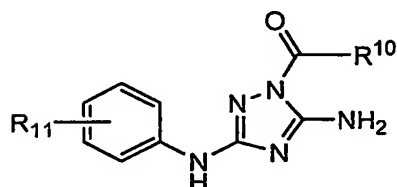
式 4

(但し、式 4 中、 R^8 は、1~3 個のハロゲン、メチル基、トリフルオロメチル基若しくは水酸基で置換されても良いフェニル基、またはキノリル基、エチルメチルスルヒド基、*t*-ブチルフェニルチオ基、*N*-エチルフェニルアミノ基であり、 R^9 は、水酸基、またはアミノ基を表す)



式 5

(但し、式 5 中、 n は、1~3、 X は、-NH-又は-CONH-であり、 Y は、水酸基、ピペリジン、ピロリジン、ピペラジン、ピラゾール又はトリアゾールを表す)



式 6

(但し、式6中、 R^{10} は、ハロゲン、メチル基、エチル基若しくは t -ブチル基で置換されてもよい2-チエニル基若しくはフェニル基であり、 R^{11} は、 $-SO_2-NH_2$ 、 $-SO_2-NHMe$ 又は $-SO_2-NH[(CH_2)_2N(CH_3)_2]$ を表す)、

又はその薬剤上許容できる塩である請求項12記載の腎疾患の治療又は予防剤。

5 14. 前記カゼインキナーゼ2を阻害する物質が、上記式1(各置換基の定義は上記と同じ)で表される化合物又はその薬剤上許容できる塩である請求項13記載の腎疾患の治療又は予防剤。

15. 前記式1中、 R^1 は水素原子または式2に表される置換基から選ばれる1種乃至は2種以上を有していても良いフェニル基を表し、 R^2 は水素、または水
10 酸基を表し、 R^5 は水素原子である請求項14記載の腎疾患の治療又は予防剤。

16. 前記カゼインキナーゼ2を阻害する物質が、アピゲニンである請求項15記載の腎疾患の治療又は予防剤。

17. 腎疾患が、糸球体腎炎、間質性腎炎、腎硬化症、糖尿病性腎症、慢性又は急性腎不全である請求項1ないし16のいずれか1項に記載の腎疾患の治療又は
15 予防剤。

18. 腎疾患が、糖尿病に起因しない腎炎である、またはカゼインキナーゼ2の発現亢進もしくは酵素活性亢進により特徴づけられる、請求項1～16のいずれか1項に記載の腎疾患の治療又は予防剤。

19. 請求項1ないし18のいずれか1項に記載のカゼインキナーゼ2を阻害
20 する物質の、腎疾患の治療又は予防剤製造のための使用。

20. 請求項1ないし18のいずれか1項に記載のカゼインキナーゼ2を阻害する物質の有効量を、腎疾患患者若しくは動物又は腎疾患の予防が望まれるヒト若しくは動物に投与することを含む腎疾患の治療又は予防方法。

21. 生体から分離した試料中のカゼインキナーゼ2の活性若しくは含有量又はカゼインキナーゼ2遺伝子の発現量を測定することを含む、腎疾患の診断方法。
25

22. 前記試料は、腎臓の構成細胞である21記載の方法。

23. 前記カゼインキナーゼ2が、 α サブユニット及び/又は α' サブユニットである請求項21又は22記載の方法。

24. 腎疾患が、糸球体腎炎、間質性腎炎、腎硬化症、糖尿病性腎症、慢性又は急性腎不全である請求項21ないし23のいずれか1項に記載の方法。

25. 腎疾患が、糖尿病に起因しない腎炎である、またはカゼインキナーゼ2の発現亢進もしくは酵素活性亢進により特徴づけられる、請求項21ないし23のいずれか1項に記載の方法。

26. カゼインキナーゼ2遺伝子の発現量を測定することを含む請求項21ないし25のいずれか1項に記載の方法。

27. カゼインキナーゼ2遺伝子のセンス鎖又はアンチセンス鎖中の領域と相補的な塩基配列を有し、請求項26記載の方法に用いられるオリゴヌクレオチド。

28. 遺伝子増幅用プライマー又は遺伝子検出用プローブである請求項27記載のオリゴヌクレオチド。

1 / 7

発現比(カゼインキナーゼ/G3PDH)

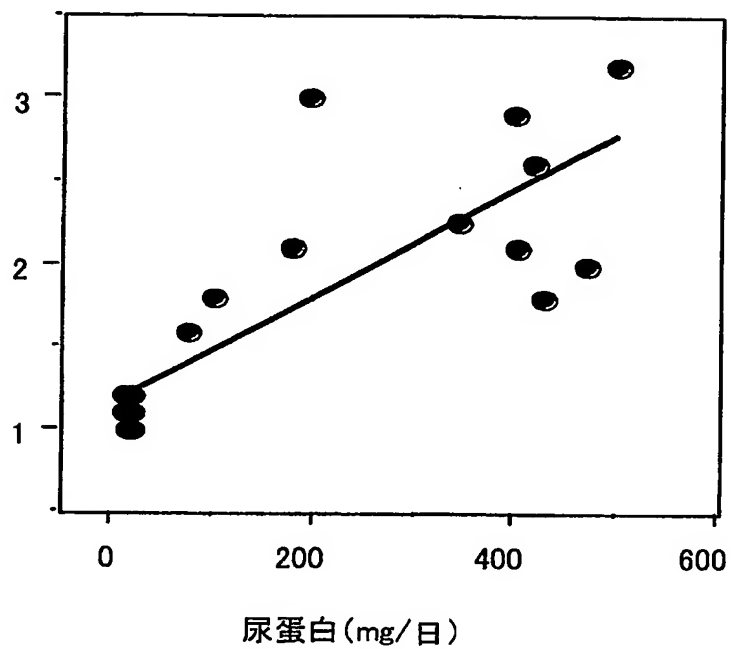


図 1

2 / 7

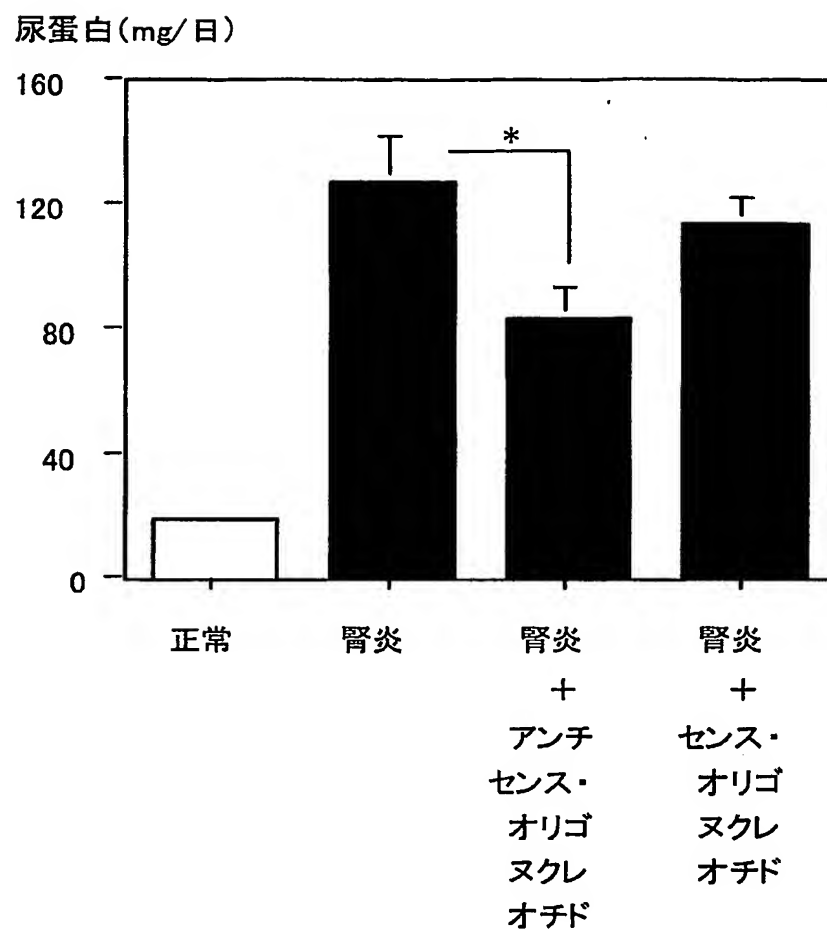


図 2

3 / 7

カゼインキナーゼ酵素活性 (%)

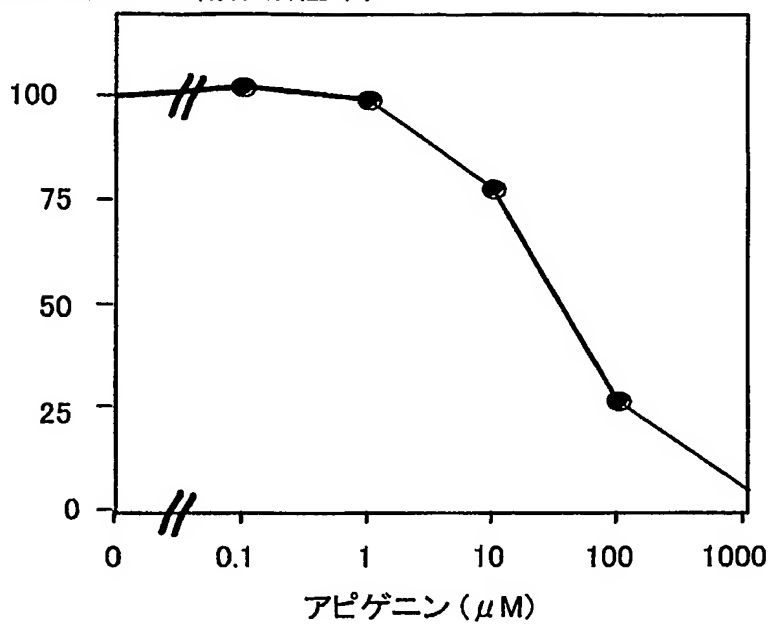


図 3

4 / 7

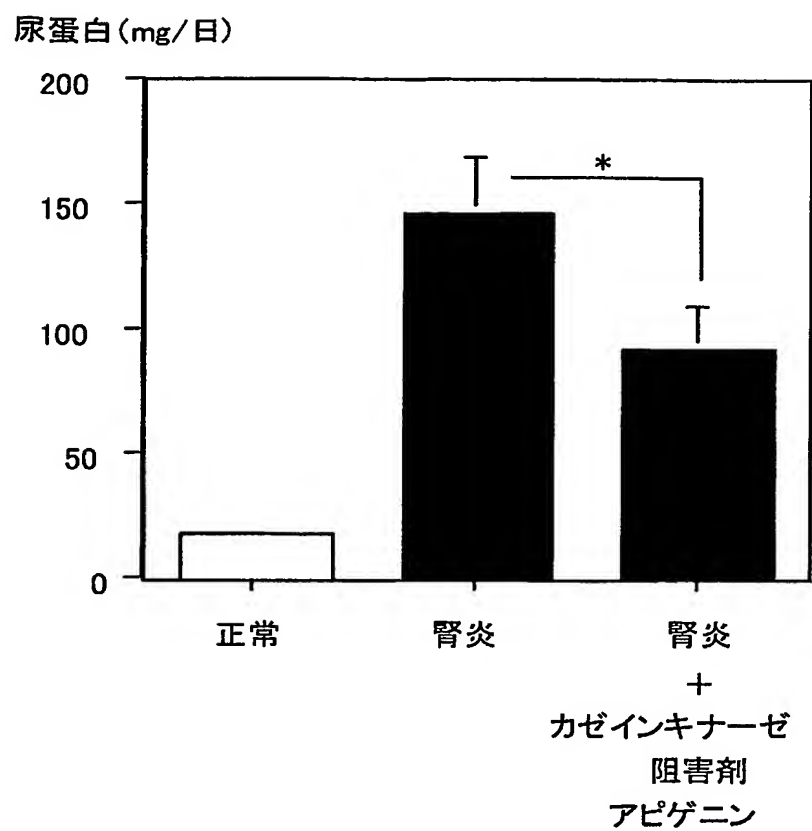


図 4

5 / 7

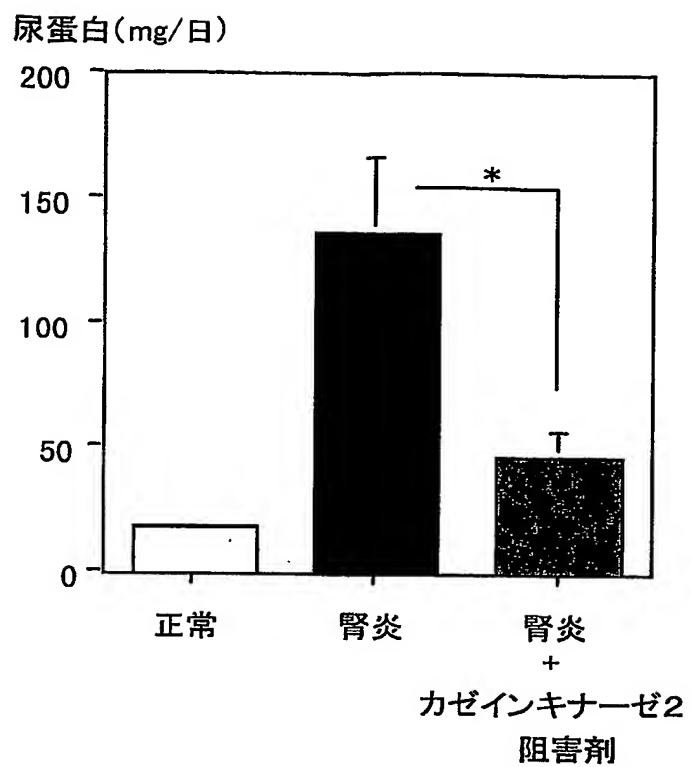


図 5

6 / 7

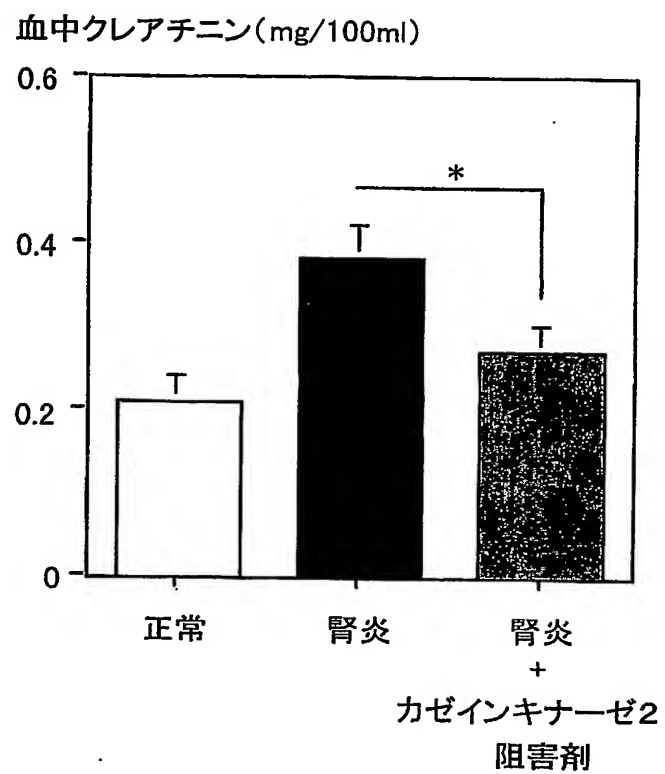


図6

7/7

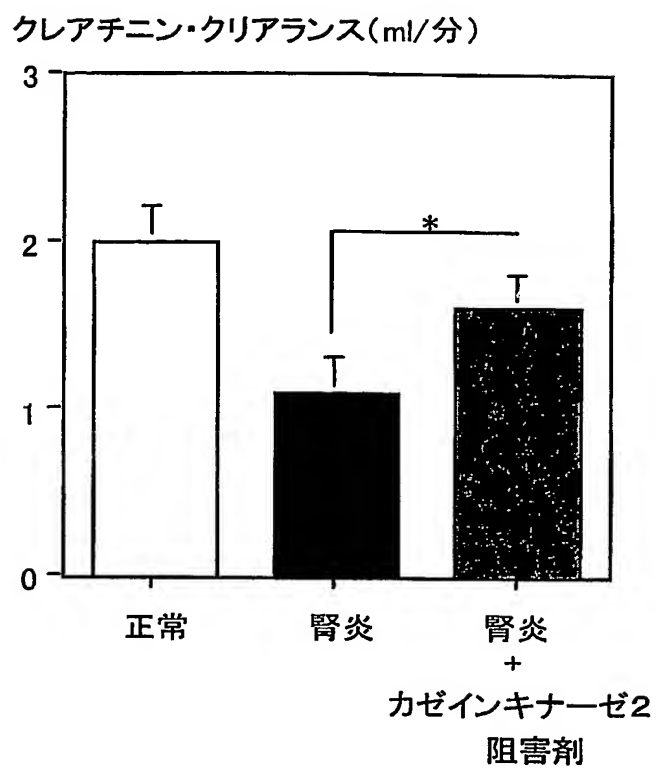


図7